

Vergleich verschiedener Methoden der Spermaaufbereitung bei der Kryokonservierung von
Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Ruth Elisabeth Volk
aus Waiblingen

Gießen 2003

Aus dem Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Direktor: Prof. Dr.med. Dr. med. habil. W.-B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. Köhn

Gutachter: Prof. Dr. Weidner

Tag der Disputation: 26.04.2004

Inhaltsverzeichnis

1. Einführung	04
1.1 Einleitung	04
1.2 Ziele der Arbeit	06
2. Material und Methoden	08
2.1 Versuchsaufbau	08
2.2 Patientenkollektiv	08
2.3 Verwendetes Arbeitsmaterial	09
2.3.1 Medium	09
2.3.2 Glaswollsäulen	10
2.3.3 Migration-Sedimentation-Spezialröhrchen	11
2.3.4 Pentoxifyllin	12
2.3.5 Kryoprotektivum	12
2.3.6 Verpackungsset für die Kryokonservierung	13
2.3.7 Geräte zur Kryokonservierung	13
2.3.7.1 Nicool LM 10	
2.3.7.2 Planer Kryo 10	
2.3.8 Material zum Mikroskopieren	16
2.3.9 Pipetten	16
2.3.10 Eosinlösung	16
2.3.11 Arbeitslösung zur Bestimmung von peroxidase-positiven Zellen	17
2.4 Methoden	17
2.4.1 Erstellen von Spermiogrammen nach WHO-Richtlinien	17
2.4.1.1 Bestimmung der Spermatozoenkonzentration	
2.4.1.2 Beurteilung der Motilität	
2.4.1.3 Beurteilung der Vitalität (Eosintest)	
2.4.1.4 Bestimmung von peroxidase-positiven Zellen	
2.4.2 Aufbereitungsmethoden	19
2.4.2.1 Glaswollfiltration vor Kryokonservierung	
2.4.2.2 Stimulation mit Pentoxifyllin vor Kryokonservierung	

2.4.2.3	Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration vor Kryokonservierung	
2.4.2.4	Stimulation mit Pentoxifyllin nach Kryokonservierung	
2.4.2.5	Migration-Sedimentation vor Kryokonservierung	
2.4.2.6	Migration-Sedimentation, anschließend Zusatz von Seminalplasma vor Kryokonservierung	
2.4.2.7	Underlay vor Kryokonservierung	
2.4.2.8	Ankonzentrieren durch Zentrifugation vor Kryokonservierung	
2.4.3	Durchführung der Kryokonservierung	21
2.4.3.4	Vorbereitung der Proben	
2.4.3.5	Auftauen der Proben	
2.4.4	Messung reaktiver Sauerstoffspezies	22
2.4.4.4	Proben	
2.4.4.5	Ankonzentrieren der Proben	
2.4.4.6	Durchführung der Messung	
2.5	Datenerfassung und Datenauswertung	23
2.5.1	Statistische Methoden und statistische Bearbeitung	23
2.5.2	Kalkulation der Zielparameter	23
2.5.2.1	Sperm-working-Wert = sw-Wert	
2.5.2.2	Total sperm count = tsc-Wert	
2.5.2.3	Real sperm count = rsc-Wert	
2.5.2.4	Auswertung der Ergebnisse	
3.	Ergebnisse	26
3.1	Spermatozoenkonzentration	26
3.2	Motile Spermatozoen	31
3.2.1	Motile Spermatozoen in Prozent von der Gesamtzahl	31
3.2.2	Motile Spermatozoen pro μl	33
3.2.3	Motile Spermatozoen pro 1ml eingesetztem Ejakulat	38
3.3	Nicht vitale Spermatozoen nach Kryokonservierung	41
3.3.1	Nicht vitale Spermatozoen in Prozent der Gesamtspermatozoenzahl	41
3.3.2	Nicht vitale Spermatozoen nach Kryokonservierung, bezogen auf 1ml eingesetztes Nativejakulat	42
3.4	Immotilität nach Kryokonservierung	43

3.5	Messung von reaktiven Sauerstoffspezies	44
3.5.1	Spermatozoenkonzentration der Proben	44
3.5.2	Ergebnisse	44
3.5.3	Statistische Auswertung der Messergebnisse	45
4.	Diskussion	46
4.1	Versuchsaufbau und Probenauswahl	46
4.2	Aufbereitungsmethoden	47
4.2.1	Glaswollfiltration	47
4.2.2	Stimulation mit Pentoxifyllin	49
4.2.3	Migration-Sedimentation	51
4.2.4	Underlay	53
4.2.5	Ankonzentrieren durch Zentrifugation	53
4.3	Betrachtung der Zielparameter	55
4.3.1	Spermatozoenkonzentration	55
4.3.2	Immotilität nach Kryokonservierung	56
4.4	Zusammenfassende Bewertung der Methoden	57
5.	Literatur	59
6.	Zusammenfassung	66
7.	Lebenslauf	67
8.	Danksagungen	68

1 Einführung

1.1 Einleitung

Die Kryokonservierung von Sperma ist eine etablierte Methode zur Lagerung menschlicher Spermatozoen vor geplanter heterologer oder homologer Insemination. 1949 konnten Polge et al. über erste erfolgreiche Versuche der Kryokonservierung boviner Spermatozoen unter Zuhilfenahme des Kryoprotektivums Glycerol berichten [64]. Kurze Zeit später hielt die Kryokonservierung von Spermatozoen auch Einzug in die Humanmedizin [19].

Vor der Kryokonservierung werden zunächst nach der Verflüssigung ein Spermiogramm nach den aktuellen Richtlinien der WHO erstellt und dadurch u.a. Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Morphologie bestimmt [85]. Die WHO definiert eine normale Spermatozoenkonzentration mit $> 20 \times 10^6/\text{ml}$ [85]. Eine geringere Spermatozoenkonzentration wird als „Oligozoospermie“ bezeichnet. Die vorliegende Arbeit untersucht die Kryokonservierung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie; d.h. Spermatozoenkonzentrationen $< 5,0 \times 10^6/\text{ml}$.

Damit die Spermatozoen die Kryokonservierung ohne vollständigen Verlust der Vitalität überstehen, wird die Ejakulatprobe mit einem Kryoprotektivum versetzt. Das früher eingesetzte Eigelbzitratmedium (EZM) musste jeweils frisch zubereitet werden [13,36]. Der Bestandteil Eigelb galt nicht nur als instabiler und schlecht standardisierbarer Faktor des Kryoprotektivums, sondern wurde auch als Antigen, Infektionsquelle für Viren oder potentieller Auslöser allergischer Reaktionen beim Vorgang der Insemination gesehen [36]. Die inzwischen üblichen Fertigkryoprotektiva bieten als Vorteile einfache Handhabung und lange Stabilität und bestehen im Wesentlichen aus einer Zellkulturlösung unter Zugabe von Humanalbumin, Glycerin und Kallikrein [35].

Durch Zugabe des Kryoprotektivums soll die Abnahme von Motilität und Vitalität nach Kryokonservierung so gering wie möglich gehalten werden [34]. Die mit Kryoprotektivum versetzte Probe wird in je 0,25 ml fassende Straws zur Aufbewahrung gefüllt. Nach maschineller Abkühlung werden die Proben in speziellen Behältern in flüssigem Stickstoff bei -196°C gelagert. Das Auftauen der Proben erfolgt bei Raumtemperatur oder im Wasserbad. Die aufgetaute Probe kann dann im Rahmen von Methoden der assistierten Reproduktion eingesetzt werden.

Der Gefrier-/Auftauprozess im Rahmen der Kryokonservierung humaner Spermatozoen führt durch strukturelle Schädigung der Spermatozoenmembran mit Beeinträchtigung der Permeabilitätsbarriere zu einer Reduktion von Motilität und Vitalität von Spermatozoen [7,8,21,23,39]. Der Einsatz der Kryokonservierung in der assistierten Reproduktion wird so erheblich beeinträchtigt [7,8]. Die Zugabe des in die Spermatozoen eindringenden hyperosmolaren Kryoprotektivums bewirkt intrazellulär temporäre Schwankungen der Osmolarität, die durch nachfolgenden Wassereinstrom in die Zellen ausgeglichen werden [1,76]. Beim Kryokonservieren schrumpfen die Spermatozoen reversibel [29,76]. Zu rasches Abkühlen führt durch Bildung intrazellulärer Eisformationen aus in den Zellen verbleibenden Wasserresten in den meisten Fällen zum Zelltod [1]. Zu langsames Abkühlen hingegen birgt die Gefahr eines zu großen intrazellulären Wasserverlustes, so dass über lange Zeit hyperosmolare Verhältnisse im Zellinneren herrschen, was gleichfalls zum Zelltod führen kann [1].

Durch einen nach Kryokonservierung verminderten Anteil an Spermatozoen mit intaktem Akrosom sowie gleichzeitig verminderter Akrosin-Aktivität wird die Fertilisierungsfähigkeit reduziert [48,54]. Der Rückgang der Motilität wurde auch mit einer nach Kryokonservierung reduzierten metabolischen Rate in Verbindung gebracht [29]. Beschrieben sind in diesem Zusammenhang u.a. reduzierte intrazelluläre Konzentrationen von Adenosintriphosphat oder Acetylcarnitinen [15,28].

Die Einrichtung von Kryospermabanken diente zunächst der Lagerung von Sperma vor geplanten homologen oder heterologen Inseminationen [70]. Bis zum Ende der 70er Jahre konnte Kryosperma nur für Inseminationen verwendet werden. Hierfür waren Mindestanforderungen an die Spermaqualität notwendig. Das führte dazu, dass Sperma stark reduzierter Qualität nicht kryokonserviert wurde.

Durch Einführung der IVF sank die Zahl der für die Befruchtung notwendigen Spermatozoen. Doch erst die Möglichkeiten der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) führten zur Aufgabe von Minimalanforderungen an die Ejakulatqualität vor Kryokonservierung. Da pro Eizelle bei der ICSI nur noch eine vitale Spermatozoe notwendig ist, können nun auch Ejakulate kryokonserviert werden, die hochgradige Verminderungen von Spermatozoenkonzentration oder Motilität aufweisen. Davon profitieren u.a. junge männliche Tumorkranke.

Früherkennung und verbesserte Therapien haben die Überlebenschancen von Tumorpatienten im reproduktionsfähigen Alter deutlich steigen lassen. Notwendige chirurgische, radiologische und chemotherapeutische Maßnahmen ziehen jedoch häufig eine gestörte Fortpflanzungsfähigkeit nach sich, so dass für diese Patienten bei noch nicht abgeschlossener Familienplanung die Anlage eines Spermadepots empfohlen wird [42,71,84]. Viele Tumorpatienten weisen bereits vor Therapiebeginn Einschränkungen der Ejakulatqualität auf, so dass hier Methoden zur Verbesserung der Motilität und Vitalität der Spermatozoen nach dem Auftauen vorteilhaft wären [31,42,43,71].

Eine weitere neue Indikation für die Kryokonservierung betrifft Patienten mit Wechsel von Kryptozoospermie oder hochgradiger Oligozoospermie und Azoospermie. Bei andrologischen Patienten mit hochgradig eingeschränkter Spermaqualität sind ebenso wie für gesunde Männer intra- und interindividuelle Schwankungen von Spermatozoenkonzentration und Motilität bekannt [44,59]. Insbesondere für die Patienten mit hochgradiger Oligozoospermie kann eine weitere Verschlechterung der Spermaqualität das Scheitern eines ICSI-Zyklus bedeuten, falls am Tag der geplanten ICSI eine temporäre Azoospermie auftritt [44,79]. Die vorherige Anlage von Spermadepots könnte dieses Problem lösen.

1.2 Ziele der Arbeit

Spermatozoen von Patienten mit hochgradig eingeschränkter Spermaqualität überstehen den Gefrier-/Auftauvorgang nur mit deutlich höheren Verlusten bezüglich der prozentualen und absoluten Anzahl motiler Spermatozoen als auch der Überlebensrate [45,69,73].

Das Problem der Kryokonservierung von Ejakulaten mit sehr niedrigen Spermatozoenkonzentrationen und reduzierter Motilität besteht darin, dass die wenigen Spermatozoen durch die weitere Verdünnung mit dem Kryoprotektivum nach dem Auftauen nur noch schlecht auffindbar sind und den Gefrier-/Auftauvorgang schlechter überleben als Spermatozoen aus Ejakulaten besserer Qualität. Dies zeigt sich in deutlich höheren Verlusten bezüglich der prozentualen und absoluten Anzahl motiler Spermatozoen als auch der niedrigeren Überlebensrate nach Kryokonservierung [45,69].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, verschiedene Möglichkeiten der Spermaaufbereitung im Zusammenhang mit der Kryokonservierung menschlicher

Spermatozoen daraufhin zu untersuchen, die Motilität der Samenzellen zu erhalten und das Auffinden motiler Spermatozoen nach dem Auftauen zu erleichtern. Hierfür boten sich bei der Versuchsplanung zwei verschiedene potentielle Verfahren an:

Stimulation der Motilität vor oder nach dem Einfrier-/Auftauprozess

Ankonzentrieren der Spermatozoen, um deren Auffinden nach Zusatz des Kryoprotektivums zu erleichtern

Zur Stimulation der Motilität wurden überprüft:

Zugabe von Pentoxifyllin

Resuspendierung der Spermatozoen im eigenen Seminalplasma, um dessen protektive Eigenschaften zu nutzen

Die verwendeten Aufbereitungsverfahren waren:

Glaswollfiltration

Migration-Sedimentation

Underlay

Zentrifugation

Als Zielparameter galten:

Konzentration der Spermatozoen

Motilität

Vitalität

Im Rahmen der Arbeit wurden die oben genannten Verfahren in verschiedenen Kombinationen z.T. vor oder nach dem Einfrieren angewendet und mit dem konventionellen Einfrier-/Auftau-Prozess verglichen. Ziel war es, das Verfahren zu identifizieren, das die höchste Rate vitaler und motiler Spermatozoen nach dem Auftauen ergab. Da bei den Aufbereitungsverfahren teilweise Zentrifugationsvorgänge notwendig waren und hierbei schädigende Einflüsse durch die Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies bekannt sind, wurden außerdem in einem Versuchsarm reaktive Sauerstoffspezies gemessen.

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Der experimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde im Zeitraum von Juli 1995 bis April 1997 durchgeführt. 83 Patienten der andrologischen Ambulanz am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen gewannen nach mindestens dreitägiger Karenzzeit durch Masturbation ihr Ejakulat. Nach der üblichen Verflüssigungszeit von weniger als 60 Minuten bei Raumtemperatur wurde ein Spermogramm nach den damals gültigen Kriterien der World Health Organization WHO (1993) [85] erstellt sowie das Probenvolumen gemessen.

Mit den für die Studie ausgewählten Ejakulaten wurden verschiedene Aufbereitungsverfahren durchgeführt. Die aufbereiteten Proben wurden nach Zugabe des Kryoprotektivums für eine Dauer von mindestens 24 Stunden kryokonserviert. Nach den Aufbereitungen sowie nach Abschluß der Kryokonservierung wurden jeweils Spermogramme erstellt sowie das Probenvolumen in μl gemessen. Als Kontrolle wurde jeweils auch unaufbereitetes Ejakulat mit Kryoprotektivum kryokonserviert.

Aufgrund der bei der Aufbereitung „Ankonzentrieren vor Kryokonservierung“ erhaltenen Ergebnisse wurde ein Folgeversuch durchgeführt. An 9 Ejakulaten mit Oligozoospermie wurde die Freisetzung von reaktiven Sauerstoffspezies nach Ankonzentrieren gemessen. Zur Kontrolle wurden die reaktiven Sauerstoffspezies im unaufbereiteten Ejakulat gemessen.

2.2 Patientenkollektiv

Bei den Patienten handelte sich um 83 Männer der andrologischen Ambulanz am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Alle Patienten wiesen eine hochgradige Oligozoospermie mit einer maximalen Spermatozoenkonzentration von $5,0 \times 10^6/\text{ml}$ auf. Die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration im Nativejakulat betrug $2,74 \pm 1,27 \times 10^6/\text{ml}$. Das durchschnittliche Alter der Patienten betrug 34 Jahre, wobei der jüngste Patient 21 Jahre, der älteste 59 Jahre alt war.

2.3 Verwendetes Arbeitsmaterial

2.3.1 Medium

Für die Durchführung der Aufbereitungen wurde Human Tubular Fluid Medium nach der Zusammensetzung von Quinn et al. (1985) verwendet. Dieses Medium war wie folgt zusammengesetzt:

Tabelle 2.1:
Zusammensetzung des Human Tubular Fluid Mediums

	mM	g/l
NaCl	101,60	5,931
KCl	4,69	0,350
CaCl ₂ x 2 H ₂ O	2,04	0,301
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,20	0,050
KH ₂ PO ₄	0,37	0,050
Phenolrot		0,005
NaHCO ₃	25,00	2,100
Glukose	2,78	0,500
Na-Pyruvat	0,33	0,036
Na-Laktat (60% Sirup)	21,40	3,9982 ml
Penicillin		0,06
Streptomycinsulfat		0,05
HEPES	20,00	5,206

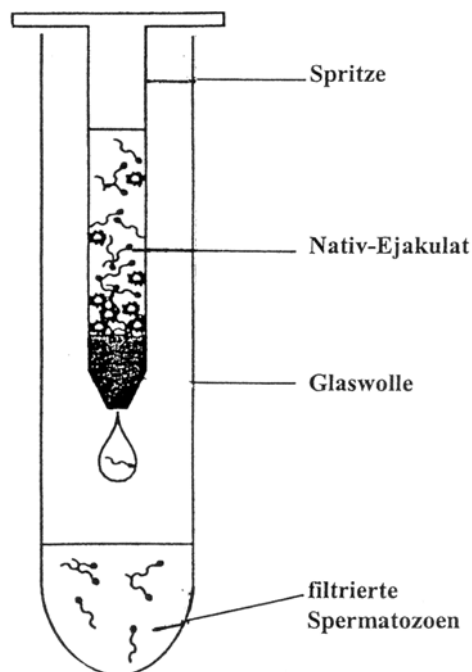
Die Osmolarität dieser Lösung wurde auf 280 mOsmol/kg eingestellt. Das Medium wurde vor Anwendung mit jeweils 10 mg humanem Serumalbumin pro ml Lösung versetzt und dann als „HTF-HSA-Medium“ bezeichnet. Das HTF-HSA-Medium hatte bei Einsatz eine Temperatur von 37°C.

2.3.2 Glaswollsäulen

Die Glaswollfiltration erfolgte mit Trennsäulen der Firma Mello Ltd., Exeter, England. Diese Trennsäulen enthalten Glasfasern, die nur von motilen Spermatozoen durchschwommen werden können. Nicht filtriert werden immotile Spermatozoen, Erythrozyten, Leukozyten und Zellreste (Abbildung 1). Mit Hilfe dieser Trennsäulen wird eine Separation motiler von immotilen Spermatozoen erreicht.

Die Glaswollsäulen wurden in ein geeignetes Reagenzglas gestellt und mit 3 ml HTF-HSA-Medium (37°C) gespült. Nach Verwerfen des Filtrats wurden auf die Säulen je 1 ml des verflüssigten Ejakulats aufgetragen und diese bei 37°C für 15 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Säulen mit 400 µl HTF-HSA-Medium (37°C) gespült. Nach Zentrifugation (10 min bei 300 x g) wurde der Überstand abgenommen und verworfen und das Pellet in 500 µl frischem HTF-HSA-Medium resuspendiert. Es folgte umgehend die Bestimmung von Motilität, Vitalität und Spermatozoenkonzentration.

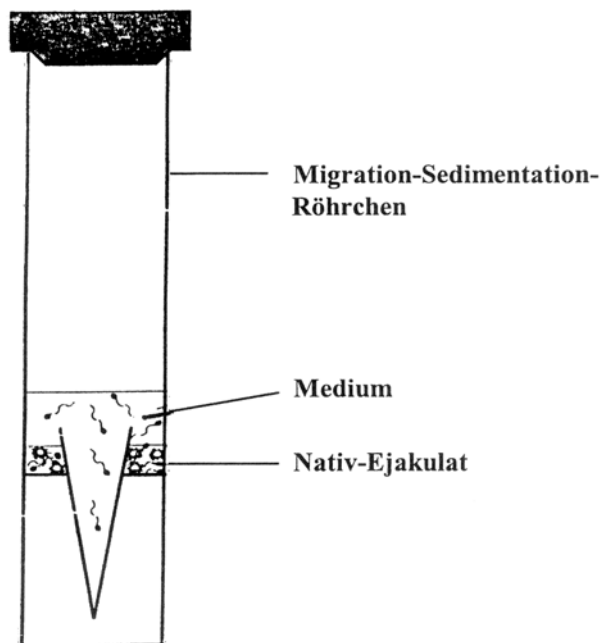
Abbildung 1: Glaswollfiltration



2.3.3 Migration-Sedimentation-Spezialröhrchen

Die Migration-Sedimentation ist eine etablierte Methode zur Spermatozoenaufbereitung im Rahmen der Verfahren der assistierten Reproduktion [46,47,77,86,87]. Für die Durchführung der Migration-Sedimentation wurden mundgeblasene Spezialröhrchen verwendet (Abbildung 2).

Abbildung 2: Migration-Sedimentation



Diese Spezialröhrchen besitzen einen inneren Kegel, über dessen Rand nur motile Spermatozoen schwimmen und dann zum Boden sedimentieren können. Immotile oder nicht vitale Spermatozoen bleiben ebenso wie Zelldetritus im den Kegel umgebenden Medium zurück. Die aus der trichterförmigen Vertiefung gewonnene Spermatozoensuspension enthält deshalb einen hohen Prozentsatz motiler Spermatozoen.

Zur Durchführung wurden zunächst 2 – 4 ml Ejakulat für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert und der Überstand bis auf 500 µl abgenommen und verworfen. Die Spezialröhrchen wurden mit je 750 µl HTF-HSA-Medium (37°C) gefüllt. Anschließend erfolgte die vorsichtige Unterschichtung des Mediums mit 250 µl des vorbereiteten Ejakulats in den äußeren Kegel. Nach 120 Minuten Inkubation bei 37°C wurde der innere Kegel vorsichtig abpipettiert. Es folgte die sofortige Bestimmung von Motilität, Vitalität und Spermatozoenkonzentration.

2.3.4 Pentoxifyllin

Pentoxifyllin wurde von Sigma Chemical Company, P.O. Box 14508 St. Louis, Mo 63178 USA bezogen. Für die Pentoxifyllin-Lösung wurden zunächst 2 mg Pentoxifyllin in 1 ml HTF-HSA-Medium (37°C, 30 Minuten) gelöst. Die Endkonzentration betrug 1 mg Pentoxifyllin pro Milliliter.

2.3.5 Kryoprotektivum

Als Kryoprotektivum wurde „SteriTec[®]“ der Firma SteriPharm, Pharmazeutische Produkte GmbH, Bundesallee 55, 10715 Berlin verwendet. Dieses Kryoprotektivum ist ein standardisiertes, gebrauchsfertiges Produkt für die Kryokonservierung von Humansperma. Es enthält Glycerin, Human-Serumalbumin, Kallikrein, Elektrolyte und eine Zellkulturlösung. Die genaue Zusammensetzung von SteriTec[®] (Mengenangaben in g/1000 g) zeigt die folgende Tabelle:

Tabelle 2.2:
Zusammensetzung des Kryoprotektivums

Substanz	G/1000ml
Natriumchlorid	5,80
Kaliumchlorid	0,40
Calciumchlorid	0,40
Saccharose	17,18
Glucose	1,00
Glycin	10,00
Humanalbumin	4,00
Kallikrein	20000 IE
Magnesiumhydrochlorid	0,10
Na-dihydrogenphosphat	0,05
Natriumbicarbonat	2,60
Natriumlaktat	1,44
HEPES	4,77
Kanamycinsulfat	0,05
Glycerol	185,00
Aqua pro injectione ad ml	1000,00

Humanalbumin und Kallikrein sind thermolabile Bestandteile des Kryoprotektivums. SteriTec® wird deshalb bei -20°C gelagert. Vor Zugabe zum Ejakulat wird SteriTec® bei Zimmertemperatur oder im Wärmeschrank oder Wasserbad bei maximal 37°C erwärmt. Das verflüssigte oder aufbereitete Ejakulat wird im Verhältnis 1/1 mit SteriTec® vermischt.

2.3.6 Verpackungsset für die Kryokonservierung

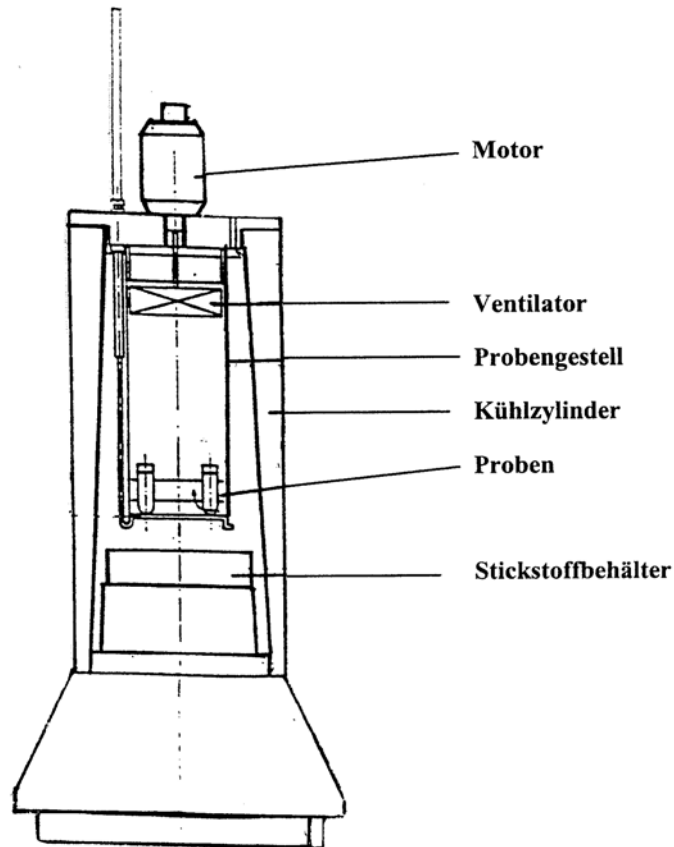
Das „Humansperma-Verpackungsset“ (HS-Set Minitüb, Artikel-Nummer 13490/0036) wurde von der Firma Minitüb GmbH Abfüll- und Labortechnik, Tiefenbach bei Landshut, bezogen. Dieses Verpackungsset wurde speziell zur Verpackung von Humansperma entwickelt. Es besteht aus 250 µl fassenden Plastikstraws und speziellen Lagerungskassetten. Die Kassetten enthalten maximal 12 Straws.

2.3.7 Geräte zur Kryokonservierung

2.3.7.1 Nicool LM 10

Der Nicool LM 10 (CFPO, Frankreich) kühlt die Proben mit Hilfe von verdampfendem flüssigen Stickstoff ab (Abbildung 3). Die vorschriftsmäßig gefüllten und verschlossenen Straws wurden in einem speziellen Aufsatz über einen mit flüssigem Stickstoff gefüllten Behälter gehängt. Mit Hilfe eines Ventilators wurden der flüssige Stickstoff verteilt und die Proben abgekühlt. Der Antrieb des Ventilators über einen 10 Geschwindigkeitsstufen besitzenden Motor ermöglichte eine stufenweise Kühlung zwischen minimal 0,5°C/Minute und maximal 10,0°C/Minute. Während der ersten 6 Minuten erfolgte die Kühlung um durchschnittlich 5°C/Minute von Raumtemperatur auf -10°C. Anschließend wurden über 20 Minuten bei Maximalgeschwindigkeit des Ventilators Kühlungsraten von 10°C/Minute erzielt. Am Ende des insgesamt 26 Minuten dauernden Abkühlvorgangs wurde so eine Probentemperatur von -125°C erreicht. Jeweils 12 vorgekühlte Proben wurden umgehend in spezielle Kassetten gefüllt und bei -196°C für mindestens 24 Stunden in flüssigem Stickstoff gelagert.

Abbildung 3: Nicool LM 10



2.3.7.2 Planer KRYO 10

Mit Hilfe des Planer KRYO 10 von Messer-Griesheim (Abbildung 4) wurden die Proben computergesteuert stufenweise bis auf -180°C abgekühlt (Abbildung 5). Der Gefriervorgang erfolgte durch die über einen Mikroprozessor gesteuerte kontrollierte Eindüsung zerstäubten Flüssigstickstoffs in die Gefrierkammer und gewährleistete so ein präzises lineares Abkühlen der Proben. Dieser computergesteuerte Abkühlvorgang dauerte insgesamt 20 Minuten. Hierbei wurden 9 verschiedene Temperaturstufen in festgelegten Zeiten durchlaufen. Während der ersten 5 Minuten erfolgte zunächst die Abkühlung auf 0°C , dieses Niveau wurde für weitere 5 Minuten gehalten. Zwischen den Zeitpunkten 10 und 20 Minuten erfolgte dann die Abkühlung bis auf -180°C . Nach erfolgreich durchlaufenem Programm wurde computergesteuert ein Protokoll des Gefriervorgangs ausgedruckt (siehe Abbildung 5). Die Proben wurden sofort in Gefrierbehälter mit flüssigem Stickstoff zur Lagerung überführt und bei -196°C mindestens 24 Stunden gelagert.

Abbildung 4: Planer KRYO 10

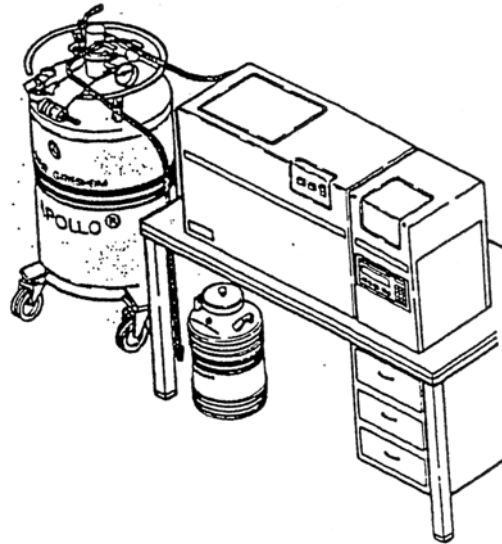
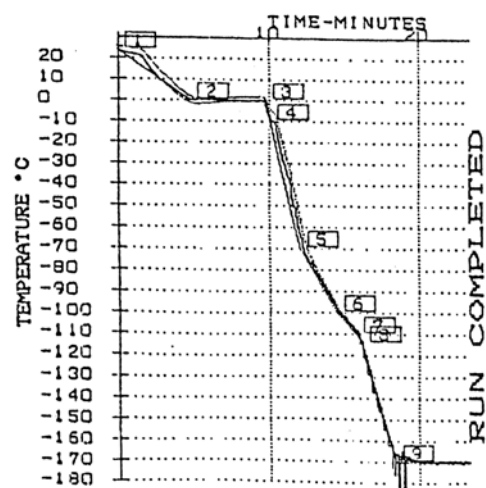


Abbildung 5: Protokoll des Abkühlvorgangs



2.3.8 Material zum Mikroskopieren

Alle mikroskopischen Untersuchungsschritte erfolgten mit dem Phasenkontrastmikroskop Axioskop der Firma Zeiss, Deutschland. Die Spermatozoen wurden bei 400facher Vergrößerung (Objektiv 40, Okular 10fache Vergrößerung) beurteilt, nachdem sie auf Objektträger der Größe 76 x 24 mm (Menzel-Gläser, Menzel GmbH, Braunschweig) aufgetragen und mit Deckgläschen (24 x 26 mm, Menzel-Gläser) abgedeckt worden waren. Die Spermatozoenkonzentration sowie die Konzentration von Rundzellen und peroxidase-positiven Zellen wurde mittels der Neubauer-Zählkammer (Brand GmbH, Wertheim) bestimmt. Die Tiefe der Kammern betrug 0,1000 mm bei einer Fläche von 0,0025 mm². Zur Differenzierung verschiedener Untergruppen bei der Auswertung der Spermatozoenmotilität wurde der Electric memory counter der Firma Hecht, Deutschland, benutzt.

2.3.9 Pipetten

Für wässrige Flüssigkeiten wurden automatisch verstellbare Pipetten der Firma Eppendorf, Deutschland, benutzt. Gemäß den Empfehlungen der WHO kamen für Pipettierschritte mit Ejakulat Kolbenpipetten (Cole-Parmer Instrument Co., Chicago, USA) auf der Basis der positiven Verdrängungstechnik zur Anwendung. Sie wurden zur Bestimmung der Spermatozoenkonzentration den automatisch verstellbaren Pipetten vorgezogen, da andere Pipetten aufgrund der viskösen Konsistenz des Ejakulates zu Ungenauigkeiten bei der Messung der Spermatozoenkonzentrationen führen können.

2.3.10 Eosinlösung

Zur Prüfung der Vitalität von Spermatozoen wurde eine Eosinfärbung benutzt. Es wurde eine 1%ige Stammlösung hergestellt aus 1 g Eosin (gelblich, Merck, Darmstadt) und 100 ml Ringer-Lösung (Clinic Salvia, Homburg/Saar). Aus dieser Stammlösung wurde eine Gebrauchslösung aus 1 Teil Stammlösung und 6 Teilen Ringerlösung hergestellt.

2.3.11 Arbeitslösung zur Bestimmung von peroxidase-positiven Zellen

Es wurde zunächst eine Stammlösung mit folgenden Inhaltsstoffen hergestellt:

Tabelle 2.3:

Zusammensetzung der Stammlösung

Aqua destillata	50 ml
Ethanol 96 %	50 ml
Benzidin (Firma Sigma)	125 mg

Zur Herstellung der Arbeitslösung wurden 4 ml der Stammlösung mit 5 ml 30%igem H_2O_2 versetzt.

2.4 Methoden

2.4.1 Erstellen von Spermiogrammen nach WHO-Richtlinien

2.4.1.1 Bestimmung der Spermatozoenkonzentration

Die Spermatozoenkonzentration wurde in der Neubauer-Zählkammer bestimmt und in Millionen Spermatozoen pro ml Lösung angegeben. Vor Auszählung der Zellen erfolgte eine Immobilisierung durch Zugabe von 10%iger NaCl-Lösung (Braun, Melsungen).

100 μl Ejakulat und 900 μl Immobilisierungslösung wurden vorsichtig vermischt. Beide Kammern der Neubauer-Zählkammer wurden mit jeweils 10 μl der Probe gefüllt. Die Zählkammer wurde für 5 Minuten in eine feuchte Kammer gestellt. Die Zellen sedimentierten und waren dann einfacher in einer Ebene zu fokussieren. Die Beurteilung erfolgte mit Hilfe eines Phasenkontrastmikroskops bei 400facher Vergrößerung.

Ausgezählt wurden die Spermatozoen im zentralen Raster der Neubauerzählkammer. Mitgezählt wurden außerdem Spermatozoen, die auf den oberen oder linken Begrenzungslinien lagen. Die Fläche unter dem zentralen Raster betrug 1 mm^2 . Bei einer Tiefe der Kammer von 0,1 mm errechnete sich das Volumen der Neubauerzählkammer mit 0,1 μl . Zur Ermittlung der Spermatozoenkonzentration musste der Verdünnungsfaktor berücksichtigt werden. Bei Ejakulaten, die mit diesem Vorgehen eine Konzentration $< 2 \times 10^6/\text{ml}$ aufwiesen, wurde die Konzentration in der Neubauer-Zählkammer mit unverdünntem Ejakulat bestimmt. Für die Bestimmung der Spermatozoenkonzentration nach Aufbereitungen oder Kryokonservierung wurde ebenfalls ohne vorherige Verdünnung gearbeitet.

Aufgrund der geringen Spermatozoenkonzentrationen bei hochgradiger Oligozoospermie und der Verdünnung durch Aufbereitungsverfahren und Zugabe des Kryoprotektivums wurde die Spermatozoenkonzentration in den weiteren Arbeitsschritten als Spermatozoenzahl pro μl angegeben.

2.4.1.2 Beurteilung der Motilität

Die Beurteilung der Spermatozoenmotilität erfolgte mikroskopisch in 10 μl Nativejakulat. Für die Beurteilung der Motilität nach den Kriterien der WHO [85] erfolgte eine systematische Untersuchung des mikroskopischen Blickfeldes in 400facher Vergrößerung. 100 aufeinanderfolgende Spermatozoen wurden hinsichtlich ihrer Beweglichkeit beurteilt und in die Kategorien a bis d nach WHO (1993) [85] eingeteilt (Tabelle 2.4). Beurteilt wurden nur frei bewegliche Spermatozoen; Konglomerate wurden nicht berücksichtigt.

Tabelle 2.4:

Motilitäts-Kriterien der WHO (1993) [85]

Motilitätsgrad nach WHO	Kriterium
Grad a	schnelle Vorwärtsbewegung, linear-progressive Motilität
Grad b	langsame Vorwärtsbewegung, d.h. träge Motilität
Grad c	keine progressive Motilität, nur lokale Motilität
Grad d	Immotilität

2.4.1.3 Beurteilung der Vitalität (Eosintest)

Immotile Spermatozoen wurden mit Hilfe des Eosintestes in vitale und avitale Spermatozoen differenziert. Dabei wurden 10 μl Ejakulat und 10 μl Eosinlösung auf einem Objektträger durchmischt (siehe 2.3.10). Nach 5 Minuten erfolgte die Beurteilung bei 400facher Vergrößerung. Vitale Spermatozoen nehmen kein Eosin auf und erscheinen deshalb ungefärbt. Nicht vitale Spermatozoen werden durch den Farbstoff im Kopfbereich intensiv rosa gefärbt, da durch die defekten Membranen Eosin in das Zellinnere aufgenommen wird.

2.4.1.4 Bestimmung von peroxidase-positiven Zellen

Die Auszählung peroxidase-positiver Zellen dient dem quantitativen Nachweis von Leukozyten im Ejakulat. Zur Bestimmung der peroxidase-positiven Zellen wurden 20 µl Ejakulat mit 20 µl der Peroxidase-Arbeitslösung vermischt (siehe 2.3.11). Nach einer Inkubation von 5 Minuten bei Zimmertemperatur wurden 160 µl HTF-HSA-Medium dazugegeben. Mit der so erhaltenen Lösung wurden beide Kammern der Neubauerzählkammer mit jeweils 10 µl der gut gemischten Lösung gefüllt. Bei 400facher Vergrößerung wurde mit dem Phasenkontrastmikroskop die Zahl der peroxidase-positiven Zellen bestimmt, die sich braun gefärbt darstellen.

2.4.2 Aufbereitungsmethoden

2.4.2.1 Glaswollfiltration vor Kryokonservierung

Die Glaswollsäule wurde mit 3 ml 37°C warmen HTF-HSA-Medium gespült und das entstehende Filtrat verworfen. Auf die gespülte Säule wurde 1 ml des verflüssigten Ejakulats aufgetragen. Die Filtration erfolgte im Wärmeschrank bei 37°C für 15 Minuten. Nach der Filtration wurde die Säule mit 400 µl HTF-HSA-Medium gespült. Sofort anschließend erfolgte die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen.

2.4.2.2 Stimulation mit Pentoxifyllin vor Kryokonservierung

Ejakulat und Pentoxifyllin-Lösung wurden im Verhältnis 1:1 gemischt, so dass die endgültige Pentoxifyllinkonzentration 1 mg/ml betrug. Nach 30 min Inkubation bei 37°C erfolgte sofort die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen.

2.4.2.3 Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration vor Kryokonservierung

Zunächst erfolgte die Stimulation mit Pentoxifyllin wie unter Abschnitt 2.4.2.2 beschrieben. Mit 1 ml Pentoxifyllin-Ejakulat-Mischung wurde eine Glaswollfiltration (siehe 2.4.2.1) durchgeführt. Vor der Kryokonservierung wurden Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen bestimmt.

2.4.2.4 Stimulation mit Pentoxifyllin nach Kryokonservierung

Bei diesem Verfahren wurde das Ejakulat ohne eine vorherige Aufbereitung sofort nach Erstellen des Spermigramms kryokonserviert. Nach einer Kryokonservierungsdauer von mindestens 24 Stunden wurden die Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut. Die

Spermatozoensuspension wurde mit Pentoxifyllin-Lösung im Verhältnis 1:1 vermischt und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen.

2.4.2.5 Migration-Sedimentation vor Kryokonservierung

Die Methode der Migration-Sedimentation dient der Separation motiler von immotilen Spermatozoen [77]. 2 ml Ejakulat wurden 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf 250 µl abgenommen und verworfen. Ein Migration-Sedimentation-Spezialröhrchen (siehe Abbildung 2) wurde zunächst mit 750 µl HTF-HSA-Medium gefüllt. Das Medium wurde mit 250 µl des konzentrierten Ejakulates vorsichtig unterschichtet. Nach einer Inkubation von 60 Minuten bei 37°C wurden aus dem Kegel des Röhrchens 250 µl Lösung abgenommen und in ein Reagenzglas überführt. In der Neubauerzählkammer erfolgte die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen. Bei zu geringer Spermatozoenkonzentration wurde erneut für 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 10 µl abgenommen und verworfen. Von der erhaltenen Suspension wurden wieder Spermatozoenkonzentration, Motilität und Vitalität bestimmt, bevor die Proben kryokonserviert wurden.

2.4.2.6 Migration-Sedimentation, anschließend Zusatz von Seminalplasma vor Kryokonservierung

Hierbei wurde zunächst eine Migration-Sedimentation (siehe 2.4.2.5) durchgeführt. Bei der Zentrifugation wurde als Überstand Seminalplasma erhalten. Das Seminalplasma wurde jedoch nicht verworfen, sondern in ein anderes Reagenzglas pipettiert. Die durch Migration-Sedimentation erhaltene Spermatozoensuspension wurde im Verhältnis 1:1 mit dem Seminalplasma derselben Probe vermischt.

2.4.2.7 Underlay vor Kryokonservierung

In ein Reagenzröhrchen wurden 1000 µl HTF-HSA-Medium gegeben. Das Röhrchen wurde in eine Schräglage von 45° gebracht und anschließend das Medium vorsichtig mit 500 µl Ejakulat unterschichtet. Diese Mischung wurde unter Beibehaltung der Schräglage 30 Minuten bei 37°C inkubiert. An der Oberfläche des Mediums reicherten sich die motilen Spermatozoen an und konnten unter weiterer Beibehaltung der Schräglage vorsichtig abpipettiert werden. In dieser Spermatozoensuspension erfolgte dann die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen, bevor kryokonserviert wurde.

2.4.2.8 Ankonzentrieren durch Zentrifugation vor Kryokonservierung

1 ml Ejakulat wurde 10 Minuten bei 300 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde bis auf 250 µl abgenommen und verworfen. Es folgte die Bestimmung von Spermatozoenkonzentration, Motilität und Vitalität. Danach wurde kryokonserviert.

2.4.3 Durchführung der Kryokonservierung

2.4.3.1 Vorbereitung der Proben

Die Proben wurden mit dem Kryoprotektivum im Verhältnis 1:1 gemischt. Die Spermatozoensuspension wurde in die Straws gefüllt und diese dann mit Metallkugeln verschlossen und in die Aufbewahrungskassetten gelegt. Die Aufbewahrungskassetten wurden in den Kryo 10, Serie III (Firma Messer-Griesheim) eingesetzt. Die Proben wurden computergesteuert bis auf -180°C abgekühlt und umgehend in Gefrierbehälter mit flüssigem Stickstoff zur Lagerung überführt (siehe 2.3.7.2). Die Dauer der Kryokonservierung betrug mindestens 24 Stunden.

2.4.3.2 Auftauen der Proben

Anfänglich war versucht worden, die gefrorenen Straws zum Auftauen in ein Wasserbad oder einen Wärmeschrank zu geben und so den Auftauvorgang bei 37°C durchzuführen. Es kam jedoch zu einer extrem hohen Verlustrate durch platzende Röhrchen, so dass alle für die Studie verwendeten Proben 15 Minuten bei Raumtemperatur aufgetaut wurden. Nach der Auftauzeit von 15 Minuten wurden die Straws geöffnet, indem ein Ende abgeschnitten wurde. Die Probenlösung wurde in Eppendorffröhrchen entleert. In den aufgetauten Proben wurden sofort Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und Volumen bestimmt.

2.4.4 Messung reaktiver Sauerstoffspezies

2.4.4.1 Proben

Bei 9 Ejakulaten mit Oligozoospermie wurde die Freisetzung von Sauerstoffspezies jeweils im Nativejakulat sowie in einer durch Zentrifugation ankonzentrierten Probe bestimmt. Die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration der eingesetzten Ejakulate betrug nativ $1,66 \pm 1,13 \times 10^6/\text{ml}$ ($0,65 \times 10^6/\text{ml} - 3,20 \times 10^6/\text{ml}$).

2.4.4.2 Ankonzentrieren der Proben

Jeweils 1 ml Ejakulat wurde 10 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig bis auf 400 μl abgenommen und verworfen. Dadurch erfolgte eine Ankonzentrierung der Spermatozoen um den Faktor 2,5. In dem ankonzentrierten Ejakulat wurden Spermatozoenkonzentration, Motilität, Vitalität und die Anzahl peroxidase-positiver Zellen sowie anderer Rundzellen bestimmt. Die gleichen Untersuchungen wurden in 400 μl unverdünntem Ejakulat derselben Probe durchgeführt und dienten als Kontrolle.

2.4.4.3 Durchführung der Messung

In einem Reagenzglas wurden 400 μl Nativejakulat (Kontrolle) bzw. 400 μl ankonzentriertes Ejakulat mit jeweils 1600 μl HTF-HSA-Medium gemischt. Die Lösung wurde 10 Minuten bei $300 \times g$ zentrifugiert und anschließend der Überstand bis auf das Pellet abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde in 800 μl HTF-HSA-Medium resuspendiert. In 100 μl dieser Suspension erfolgte die computergesteuerte Messung der reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) mit dem Hamamatsu MTP (Hamamatsu Photonics, Herrsching, Deutschland) nach Beschreibung von Henkel et al. [30]. Die Proben wurden hierzu in weiße Mikrocontainer gefüllt (Dynatech, Chantilly, VA, USA). In den Proben wurde das Chemilumineszenzsignal über eine Dauer von 15 Minuten gemessen. Eine Probe ohne Spermatozoen diente als Negativkontrolle. Von den durchschnittlich 7 Messwerten einer Probe wurde der Mittelwert x ebenso bestimmt wie von der Negativkontrolle. Nach Korrektur der gemessenen Werte wurde um den Kontrollwert korrigiert:

$$Y (\text{Anzahl der Impulse}) = x (\text{Probe}) - x (\text{Negativkontrolle}).$$

Y wurde anschließend auf die in einer 100 μl -Probe enthaltene Anzahl vitaler Spermatozoen (= vit100) bezogen und als z-Wert beschrieben:

$$Z = y / vit100.$$

Z wurde auf 10^7 vitale Spermatozoen bezogen.

Weniger als 17462 Impulse pro 10^7 vitalen Spermatozoen wurden nach Henkel et al. [30] als nicht überdurchschnittlich hoch bewertet.

2.5 Datenerfassung und Datenauswertung

2.5.1 Statistische Methoden und statistische Bearbeitung

Die Auswertung der Daten erfolgte mit SPSS für Windows (Version 6.1.3) am Institut für medizinische Informatik an der Justus-Liebig-Universität Gießen (Leiter: Prof. Dr. J. Dudeck, Betreuer Dr. Pabst). Im Rahmen der deskriptiven Statistik wurden Mittelwert, Minimum, Maximum und Standardabweichung berechnet. Zum Vergleich der einzelnen Aufbereitungsverfahren wurde eine einfache Varianzanalyse mit paarweisen Kontrasten nach der LSD-Methode (least significant difference) durchgeführt. Das Signifikanzniveau lag bei 0,05. Vergleiche zwischen Nativejakulat und durch Zentrifugation ankonzentriertem Ejakulat bezüglich der Sauerstoffradikale bei 9 Versuchspersonen wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für paarige Stichproben durchgeführt.

2.5.2 Kalkulation der Zielparameter

Da mit sehr geringen Probenvolumina und Spermatozoenkonzentrationen gearbeitet wurde, wurde die Spermatozoenkonzentration auf einen μl bezogen. Der sperm-working-Wert „sw-Wert“ gibt die Spermatozoenkonzentration pro μl an. Das für eine Aufbereitung eingesetzte Volumen des Nativejakulates wurde als „eingesetztes Volumen“ protokolliert. Das Volumen einer Probe nach einer Aufbereitung wurde unter dem Begriff „Volumen nach Aufbereitung“ in das Protokoll aufgenommen. Schließlich wurde nach dem Auftauen noch einmal das Volumen der Probe bestimmt; dieses war dann das „Volumen nach Kryokonservierung“.

Die ermittelten Zielparameter wurden dann folgendermaßen zusammengefasst:

2.5.2.1 Sperm-working-Wert = sw-Wert

Der Sperm-working-Wert (sw-Wert) gibt die Spermatozoezahl pro μl Lösung an. Aufgrund der geringen Spermatozoenkonzentrationen insbesondere nach Aufbereitungsverfahren und

Kryokonservierung wurde diesem Wert der Vorzug gegenüber der Einheit in Millionen pro ml gegeben.

2.5.2.2 Total sperm count = tsc-Wert

Dieser Wert gibt die Gesamtzahl an Spermatozoen nach Kryokonservierung an. Damit berücksichtigt der Wert das Endvolumen der Probe:

$$\text{tsc-Wert} = \text{sw - Wert} \times \text{Endvolumen } (\mu\text{l}).$$

2.5.2.3 Real sperm count = rsc-Wert:

Hier wurde die Anzahl an Spermatozoen nach Kryokonservierung bestimmt und auf 1 ml Nativejakulat bezogen:

$$\text{rsc-Wert} = \text{tsc-Wert} / \text{eingesetztes Nativvolumen } (\mu\text{l}) \times 1000 \mu\text{l}.$$

Diese Werte wurden bestimmt, um eine bessere Vergleichbarkeit und Bewertung der einzelnen Aufbereitungsverfahren zu ermöglichen. Bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kryokonservierung von Ejakulaten mit Oligozoospermie kann der Erfolg einer Aufbereitung nicht nur an der Spermatozoenzahl pro μl oder dem prozentualen Anteil der motilen Spermatozoen beurteilt werden. Vielmehr müssen auch das Volumen der Nativejakulate und somit die Effektivität der Aufbereitungsmethoden berücksichtigt werden.

2.5.2.4 Auswertung der Ergebnisse

Insgesamt wurden neun verschiedene Methoden untersucht. Aufgrund mangelnder Probenvolumina war es nicht möglich, mit einer Probe jeweils alle Aufbereitungsverfahren durchzuführen. Um dennoch eine Vergleichbarkeit der einzelnen Methoden untereinander zu erreichen, wurden für die Zielparameter zwischen dem jeweiligen Ausgangswert und dem entsprechenden Wert nach abgeschlossenem Versuch relative Differenzen gebildet:

$$\text{Differenz} = \text{Ausgangswert} - \text{Endwert}.$$

Durch diese Differenz wurde der Verlust an Spermatozoen durch ein Aufbereitungsverfahren angegeben. Da eine lineare Regression zwischen der Größe eines Ausgangswertes und der

berechneten Differenz bestand, wurde die errechnete Differenz auf den jeweiligen Ausgangswert bezogen:

$$\text{Quotient} = \text{Differenz} / \text{Ausgangswert}.$$

Dieser Quotient gab den Verlust bezogen auf den Ausgangswert an. Je kleiner der Quotient, desto geringer waren die Verluste an Spermatozoen und um so günstiger war eine Methode einzuschätzen.

3 Ergebnisse

3.1 Spermatozoenkonzentration

Die maximale Spermatozoenkonzentration der eingesetzten Ejakulate betrug 5000 Spermatozoen pro μl . Die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration aller Ejakulate betrug 2763 Spermatozoen pro μl . Die mittlere Spermatozoenkonzentration der für die verschiedenen Experimente verwendeten Ejakulate zeigte Unterschiede (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1:

Ausgangswerte: Spermatozoen pro μl in den eingesetzten Ejakulatproben

Methode	Mittelwert \pm Std Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	2749 \pm 1267	2400	5000	61
Underlay	3061 \pm 1068	3100	5000	18
Ptx	3190 \pm 1180	3000	4800	11
Ptx+Gw	3086 \pm 1045	3000	4800	7
Gw	3438 \pm 1633	4200	5000	8
Mig-Sed	1854 \pm 614	1500	3000	11
MS+Spl	2648 \pm 1034	2600	5000	25
Konz	2800 \pm 1416	2200	5000	16
nK Ptx	2948 \pm 1288	3000	5000	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration lag für die einzelnen Methoden zwischen 1854 (Migration-Sedimentation) und 3190 (Pentoxifyllin) Spermatozoen pro μl . Die für die Aufbereitung „Migration-Sedimentation“ eingesetzten Ejakulate wiesen mit 1854 die geringste Spermatozoenkonzentration pro μl auf. Durch Aufbereitungsverfahren und Kryokonservierung veränderte sich die Spermatozoenzahl pro μl . Tabelle 3.2 zeigt die unterschiedlichen Spermatozoenkonzentrationen nach abgeschlossenen Versuchen.

Tabelle 3.2:**Spermatozoen pro μ l nach Kryokonservierung**

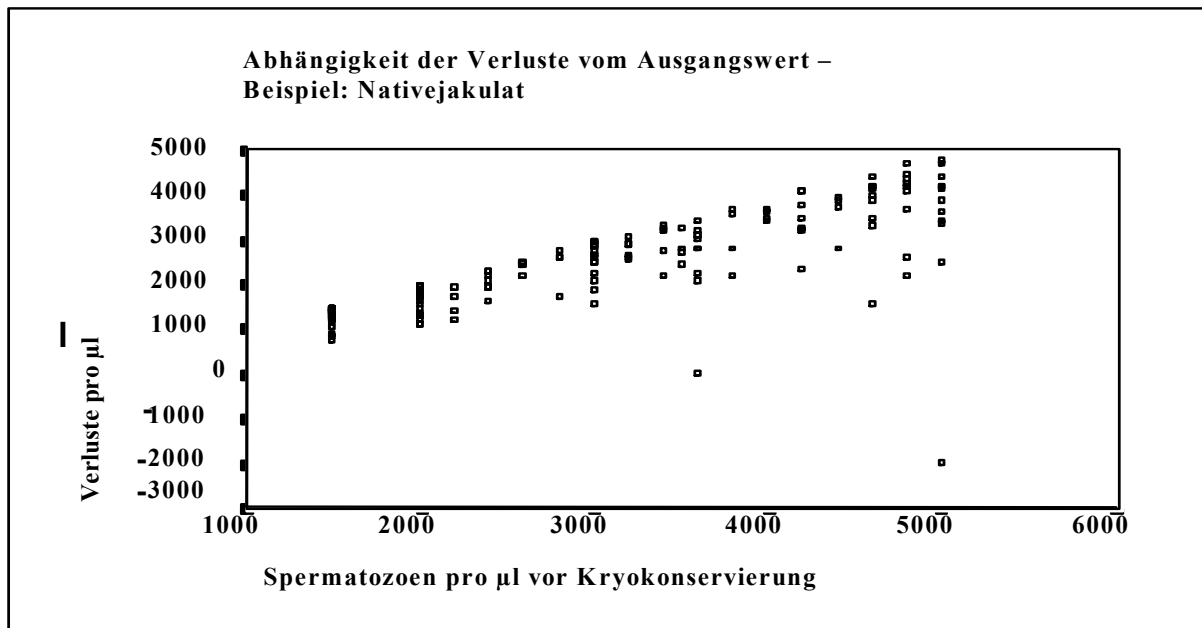
Methode	Mittelwert \pm Std.Abw	Minimum	Maximum	N
Nativ	629 \pm 501	10	2190	61
Underlay	288 \pm 189 (936 \pm 506)	20	780	18 (18)
Ptx	580 \pm 284 (1120 \pm 345)	150	1000	11 (10)
Ptx+Gw	153 \pm 127 (1028 \pm 326)	40	400	7 (7)
Gw	136 \pm 93 (728 \pm 470)	20	300	8 (7)
Mig-Sed	118 \pm 117 (597 \pm 420)	30	450	11 (6)
MS+Spl	255 \pm 310 (600 \pm 404)	10	1500	24 (12)
Konz	1581 \pm 1663 (651 \pm 503)	150	7000	18 (18)
nK Ptx	342 \pm 249 (608 \pm 484)	20	870	29 (23)

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Zahlen in Klammern geben die Werte der Kontrollgruppe an. Hierfür wurden die jeweiligen Ejakulate unaufbereitet mit Kryoprotektivum versetzt und kryokonserviert.

Um die verschiedenen Methoden miteinander vergleichen zu können, wurde die Differenz zwischen dem jeweiligen Ausgangswert und dem Endwert ermittelt. Dieser Wert gab den Verlust an Spermatozoen an. Die Größe der errechneten Differenz wurde jedoch beeinflusst von der Größe des Ausgangswertes. Für Ejakulatproben mit vergleichsweise hohen Ausgangskonzentrationen ergab sich häufig auch ein hoher Werte in der Differenzberechnung, während diese Berechnung für Ejakulate mit niedrigeren Ausgangskonzentrationen geringere Differenzen ergab und damit bessere Werte vortäuschte, weil die Bildung der Differenz die Abhängigkeit des Endwertes von der Ausgangsgröße nicht berücksichtigte. Abbildung 6 zeigt diesen Zusammenhang zwischen der Größe des Ausgangswertes und der Größe des Endwertes am Beispiel der nativ kryokonservierten Ejakulatproben.

Abbildung 6: Abhängigkeit der Verluste vom Ausgangswert



In den verschiedenen Gruppen war die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration der eingesetzten Ejakulatproben unterschiedlich (siehe Tabelle 3.1). Ejakulate mit einer hohen Ausgangskonzentration zeigten auch hohe Werte für die gebildete Differenz. Ohne Berücksichtigung der Größe der Ausgangsspermatozoenkonzentration war eine Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Methoden nicht möglich.

Zu diesem Zweck wurde jeweils der Quotient Differenz/Ausgangswert gebildet. Mit diesen Quotienten konnten die einzelnen Methoden untereinander verglichen werden. Tabelle 3.3 zeigt die Quotienten der einzelnen Methoden im Vergleich.

Tabelle 3.3:
Spermatozoen pro μ l: Quotient Differenz/Ausgangswert

Methode	Mittelwert \pm Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	0,79 \pm 0,13	0,52	0,99	61
Underlay	0,91 \pm 0,06	0,77	0,99	18
Ptx	0,81 \pm 0,12	0,55	0,93	11
Ptx+Gw	0,95 \pm 0,04	0,89	0,98	7
Gw	0,96 \pm 0,02	0,94	0,99	8
Mig-Sed	0,93 \pm 0,08	0,7	0,99	11
MS+Spl	0,91 \pm 0,09	0,58	0,99	25
Konz	0,65 \pm 0,16	0,34	0,9	16
nK Ptx	0,89 \pm 0,06	0,78	0,99	29

Quotient = Quotient (Differenz/Ausgangswert)

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Den kleinsten Quotienten und damit die geringsten Verluste erbrachte die Methode „Ankonzentrieren“ mit einem Quotienten von 0,65. Dies war auch die einzige Methode, die geringere Verluste aufwies als die nativ kryokonservierten Proben. Bei diesen betrug der Quotient 0,79. Die höchsten und damit die ungünstigsten Werte bezüglich der Spermatozoenzahl lieferten Migration-Sedimentation, Ptx+Gw und Glaswolle. Bei diesen Methoden betrug die Verlustrate bezogen auf den jeweiligen Ausgangswert weit über 90%. Die Varianzanalyse mit angeschlossenen paarweisen Kontrasten (LSD-Test) erbrachte die in Tabelle 3.4 dargestellten Ergebnisse. Das Signifikanzniveau betrug 5 %. Die Methoden sind in absteigender Reihenfolge bezüglich ihres Erfolges geordnet.

Tabelle 3.4:

Statistischer Vergleich der Effektivität verschiedener Aufbereitungsverfahren für die Kryokonservierung
Zielparameter: Spermatozoenzahl/ μ l

Mittelwert	Methode	Konz	Nativ	Ptx	nK Ptx	Underlay	MS+Spl	Mig-Sed	Ptx+Gw	Gw
0,6468	Konz									
0,7934	Nativ	*								
0,8068	Ptx	*								
0,8932	nK Ptx	*	*	*						
0,9069	Underlay	*	*	*						
0,9122	MS+Spl	*	*	*						
0,9253	Mig-Sed	*	*	*						
0,9544	Ptx+Gw	*	*	*						
0,9626	Gw	*	*	*						

Ergebnis Varianzanalyse global: $p = 0,0000$

Gruppenvariablen absteigend geordnet nach bester Methode

***statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen 2 Methoden auf 5% Niveau**

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Am besten schnitt die Methode Ankonzentrieren ab. Sie erbrachte gegenüber allen anderen Methoden signifikant höhere Spermatozoenzahlen pro μ l nach Kryokonservierung. Die Methoden Nativ und Pentoxifyllin waren ebenfalls anderen Methoden signifikant überlegen: Die Verluste waren bei diesen beiden Methoden jeweils signifikant geringer als bei den Methoden nK Ptx, Underlay, MS+Spl, Mig-Sed, Ptx+Gw und Gw.

3.2 Motile Spermatozoen

3.2.1 Motile Spermatozoen in Prozent von der Gesamtzahl

Die Kryokonservierung führte regelmäßig zu einer deutlichen Reduktion der Spermatozoenmotilität. Die eingesetzten Ejakulate lagen mit einer Globalmotilität (WHO a+b+c) von 25% bereits deutlich unter dem von der WHO festgelegten Normalwert von 50% motilen (WHO a+b) Spermatozoen. Durch Aufbereitungsverfahren konnte der prozentuale Anteil motiler Spermatozoen zum Teil deutlich erhöht werden. Die Kryokonservierung führte jedoch zu einem drastischen Rückgang des Anteils motiler Spermatozoen, wie Abbildung 7 zeigt. Die entsprechenden Werte sind in Tabelle 3.5 dargestellt.

Abbildung 7: Spermatozoenmotilität in Prozent

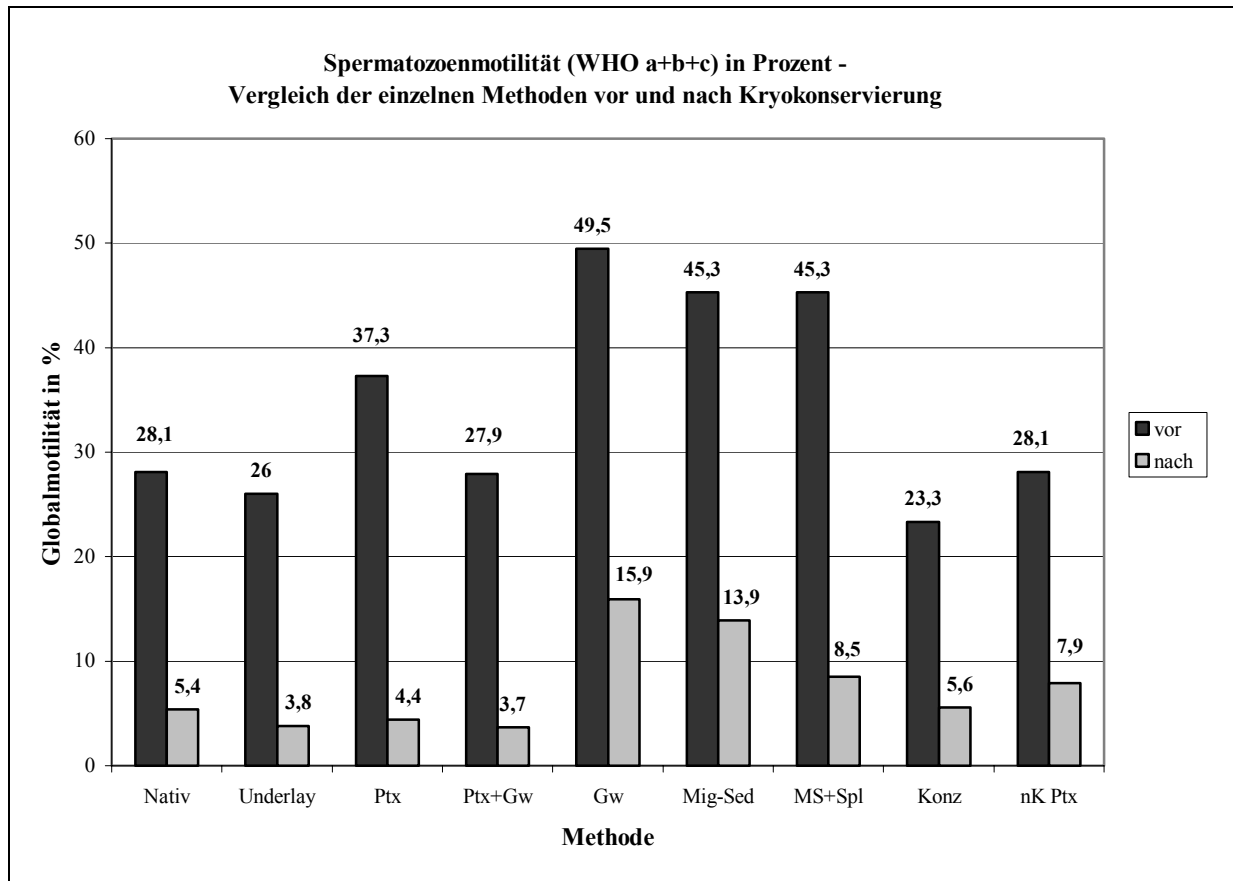


Tabelle 3.5:
Spermatozoenmotilität (WHO a+b+c) in Prozent –
Vergleich der einzelnen Methoden vor und nach Kryokonservierung

Methode	Mittelwert Std.abw.	±	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	28.1 ± 14.8	5,4	0	62	83
Underlay	26 ± 12.2	3,8 (4,2)	8	47	18
Ptx	37.3 ± 25,0	4,4 (3,8)	9	81	9
Ptx+Gw	27.9 ± 15.3	3,7 (3,1)	2	48	7
Gw	49.5 ± 26.6	15,9 (5,5)	10	89	12
Mig-Sed	45.3 ± 28.8	13,9 (1,5)	0	100	20
MS+Spl	45.3 ± 28.8	8,5 (4,9)	0	100	20
Konz	23.3 ± 12.7	5,6 (7,2)	4	57	16
nK Ptx	28.1 ± 14.8	7,9 (5,8)	0	62	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Zahlen in Klammern geben die Werte der Kontrollgruppe an. Hierfür wurden die jeweiligen Ejakulate unaufbereitet mit Kryoprotektivum versetzt und kryokonserviert.

Prozentuale Globalmotilität nach Kryokonservierung in Kursivschrift grau unterlegt.

3.2.2 Motile Spermatozoen pro μl

Neben der relativen Spermatozoenbeweglichkeit war zur Beurteilung der einzelnen Methoden die absolute Zahl motiler Spermatozoen pro μl ein weiterer wichtiger Parameter. Tabelle 3.6 zeigt den Vergleich der Ausgangswerte der motilen Spermatozoen pro μl im eingesetzten Ejakulat.

Tabelle 3.6:

Motile Spermatozoen (WHO a+b+c) pro μl – Ausgangswerte der Ejakulate vor der Aufbereitung

Methode	Mittelwert \pm Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	803 \pm 673	0	3100	61
Underlay	1059 \pm 543	238	2100	18
Ptx	116 \pm 584	105	2016	11
Ptx+Gw	1167 \pm 507	630	2016	7
Gw	1167 \pm 1147	126	3100	8
Mig-Sed	407 \pm 199	210	750	11
MS+Spl	603 \pm 508	0	2100	25
Konz	929 \pm 674	210	2100	16
nK Ptx	932 \pm 636	105	2100	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Migration-Sedimentation wurde mit Ejakulaten durchgeführt, die mit 407 Spermatozoen pro μl deutlich weniger motile Spermatozoen enthielten als Ejakulate, die nativ kryokonserviert wurden.

Tabelle 3.7 gibt einen Überblick über die Anzahl an motilen Spermatozoen pro μl nach Kryokonservierung. Dargestellt sind die Mittelwerte für das aufbereitete Ejakulat und die jeweiligen Kontrollen. Die höchste Dichte brachten die Proben der Gruppe „Ankonzentrieren“. Mit 66 motilen Spermatozoen pro μl wurde das Ergebnis der Kontrollgruppe klar übertroffen (46 pro μl). Bei allen anderen Methoden lag der erzielte Wert unter dem der jeweiligen Kontrollgruppe.

Tabelle 3.7:**Motile Spermatozoen (WHO a+b+c) pro μ l nach Aufbereitung und Kryokonservierung**

Methode	Mittelwert \pm Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	34 \pm 53	0 (0)	235	61
Underlay	11 \pm 13 (40 \pm 47)	0 (0)	41 (155)	18 (18)
Ptx	39 \pm 61 (48 \pm 58)	0 (0)	200 (160)	11 (10)
Ptx+Gw	14 \pm 35 (41 \pm 56)	0 (0)	100 (163)	7 (7)
Gw	29 \pm 29 (66 \pm 97)	0 (0)	90 (235)	8 (7)
Mig-Sed	10 \pm 18 (14 \pm 31)	0 (0)	60 (84)	11 (6)
MS+Spl	15 \pm 17 (29 \pm 36)	0 (0)	49 (134)	24 (12)
Konz	66 \pm 79 (46 \pm 47)	0 (0)	282 (149)	18 (18)
nK Ptx	27 \pm 32 (38 \pm 45)	0 (0)	127 (147)	29 (23)

Werte der Kontrollen in Klammern

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Tabelle 3.8 gibt die Verluste jeder Methode an. Die Verluste errechneten sich aus der Differenz zwischen dem jeweiligen Ausgangswert an motilen Spermatozoen pro μ l und dem Endwert nach vollständig durchgeführter Aufbereitung und Kryokonservierung.

Tabelle 3.8:**Motile Spermatozoen (WHO a+b+c) pro μl : Differenz Ausgangswert – Endwert**

Methode	Mittelwert \pm Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	769 \pm 638	0	2865	61
Underlay	1048 \pm 539	238	2069	18
Ptx	1079 \pm 570	105	2016	11
Ptx+Gw	1152 \pm 521	630	2016	7
Gw	1138 \pm 1124	96	3054	8
Mig-Sed	398 \pm 199	210	750	11
MS+Spl	544 \pm 459	0	2052	25
Konz	860 \pm 658	178	2100	16
nK Ptx	905 \pm 629	85	2032	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Es bestätigt sich die bereits zur Beurteilung der Verluste bei der Spermatozoenzahl pro μl gemachte Aussage. Große Ausgangswerte sind mit großen Verlusten kombiniert. Deshalb erfolgte die Bildung der Quotienten (siehe 3.1). Diese sind in Tabelle 3.9 wiedergegeben.

Tabelle 3.9:**Motile Spermatozoen (WHO a+b+c) pro μl : Quotient Differenz/Ausgangswert**

Methode	Mittelwert \pm Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	0,96 \pm 0,08	0,44	1	61
Underlay	0,99 \pm 0,01	0,95	1	18
Ptx	0,97 \pm 0,04	0,88	1	11
Ptx+Gw	0,98 \pm 0,05	0,87	1	7
Gw	0,96 \pm 0,08	0,76	1	8
Mig-Sed	0,98 \pm 0,05	0,86	1	11
MS+Spl	0,97 \pm 0,04	0,86	1	25
Konz	0,90 \pm 0,11	0,67	1	16
nK Ptx	0,96 \pm 0,07	0,76	1	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Die Methode mit dem kleinsten Quotienten und damit bestem Wert bezüglich ihrer Effektivität, nach dem Auftauen große Zahlen motiler Spermatozoen zu gewährleisten, war Ankonzentrieren. Der Quotient betrug 0,90 und hebt sich von allen anderen Methoden ab. Die durchgeführte Varianzanalyse mit paarweisen Kontrasten nach LSD ergab die in Tabelle 3.10 dargestellten Ergebnisse. Das Signifikanzniveau lag bei 5 %.

Tabelle 3.10:**Statistischer Vergleich der Effektivität verschiedener Aufbereitungsverfahren -****Zielparameter: Motilität (WHO a+b+c)**

Mittelwert	Methode	Konz	nK Ptx	Gw	Nativ	Ptx	MS+Spl	Mig-Sed	Ptx+Gw	Underlay
0,9035	Konz									
0,9551	nK Ptx	*								
0,9576	Gw									
0,9592	Nativ	*								
0,9708	Ptx	*								
0,9709	MS+Spl	*								
0,9757	Mig-Sed	*								
0,9810	Ptx+Gw	*								
0,9902	Underlay	*								

Ergebnis Varianzanalyse global: p = 0,0031**Gruppenvariablen absteigend geordnet nach bester Methode***** statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen Methoden auf 5% Niveau**

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Die Methode Ankonzentrieren lieferte eine signifikant höhere Anzahl an motilen Spermatozoen pro μl als die anderen durchgeführten Methoden außer der Glaswollfiltration. Keine der anderen Methoden war einer weiteren überlegen.

3.2.3 Motile Spermatozoen pro 1 ml eingesetztem Ejakulat

Die Zahl motiler Spermatozoen (WHO a+b+c) nach Kryokonservierung wurde auf 1 ml Nativejakulat bezogen. Tabelle 3.11 zeigt die Ausgangswerte für die einzelnen Methoden.

Tabelle 3.11:

Ausgangswert motiler Spermatozoen (WHO a+b+c) pro 1 ml eingesetztem Nativejakulat

Methode	Mittelwert (x 10 ⁶) ±Std.Abw. (x 10 ⁶)	Minimum (x 10 ⁶)	Maximum (x 10 ⁶)	Fallzahl
Nativ	0,803 ± 0,673	0	3,100	61
Underlay	1,059 ± 0,543	0,238	2,100	18
Ptx	1,116 ± 0,584	0,105	2,016	11
Ptx+Gw	1,167 ± 0,507	0,630	2,016	7
Gw	1,167 ± 1,147	0,126	3,100	8
Mig-Sed	0,408 ± 0,199	0,210	0,750	11
MS+Spl	0,603 ± 0,051	0	2,100	25
Konz	0,929 ± 0,674	0,210	2,100	16
nK Ptx	0,932 ± 0,636	0,105	2,100	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Die Bestimmung der Ausgangswerte sowie der Differenzen zwischen Ausgangswert und Endwert bestätigt zunächst die bereits zuvor erhobenen Ergebnisse. Tabelle 3.12 zeigt die Quotienten Differenz/Ausgangswert für die rsc-Werte.

Tabelle 3.12:

Anzahl motiler Spermatozoen (WHO a+b+c) nach Aufbereitung und Kryokonservierung, bezogen auf 1 ml eingesetztes Nativejakulat: Quotient Differenz/Ausgangswert

Methode	Mittelwert ± Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	0,92 ± 0,16	0,13	1	61
Underlay	0,99 ± 0,02	0,95	1	18
Ptx	0,88 ± 0,16	0,53	1	11
Ptx+Gw	0,97 ± 0,12	0,63	1	7
Gw	0,91 ± 0,19	0,44	1	8
Mig-Sed	0,99 ± 0,10	0,97	1	11
MS+Spl	0,99 ± 0,01	0,96	1	25
Konz	0,98 ± 0,02	0,93	1	16
nK Ptx	0,82 ± 0,27	0,06	1	29

Nativ = Nativejakulat; Underlay= Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Den kleinsten und damit günstigsten Wert zeigt nK Ptx. Die nativ kryokonservierten Ejakulate liegen an 4. Stelle. Die Varianzanalyse (Tabelle 3.13) bestätigt dieses Ergebnis.

Tabelle 3.13:**Statistischer Vergleich der Effektivität verschiedener Aufbereitungsverfahren –****Zielparmeter: Anzahl der motilen Spermatozoen (WHO a+b+c) pro 1ml eingesetztem Ejakulat**

Mittelwert	Methode	nK	Ptx	Ptx	Gw	Nativ	Ptx+Gw	Konz	Underlay	MS+Spl	Mig-Sed
0,8205	nK Ptx										
0,8833	Ptx										
0,9061	Gw										
0,9184	Nativ			*							
0,9714	Ptx+Gw			*							
0,9833	Konz			*							
0,9862	Underlay			*							
0,9899	MS+Spl			*							
0,9941	Mig-Sed			*							

Ergebnis Varianzanalyse global: p = 0,0014**Gruppenvariablen absteigend geordnet nach bester Methode***** statistisch signifikanter Unterschied zwischen den jeweiligen 2 Methoden auf 5% Niveau**

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

3.3 Nicht vitale Spermatozoen nach Kryokonservierung

3.3.1 Nicht vitale Spermatozoen in Prozent der Gesamtspermatozoenzahl

Tabelle 3.14 zeigt den prozentualen Anteil der nicht vitalen Spermatozoen an der Gesamtspermatozoenzahl.

Tabelle 3.14:

Prozentualer Anteil nicht vitaler Spermatozoen an der Gesamtspermatozoenzahl nach Aufbereitung und Kryokonservierung

Methode	Mittelwert ± Std.Abw.	Minimum	Maximum	Fallzahl
Nativ	81 ± 11	42	100	61
Underlay	82 ± 9 (77 ± 11)	68 (57)	92 (100)	18 (18)
Ptx	78 ± 11 (73 ± 11)	60 (65)	93 (93)	11 (10)
Ptx+Gw	81 ± 20 (75 ± 10)	47 (72)	100 (100)	7 (7)
Gw	85 ± 9 (84 ± 8)	70 (63)	100 (92)	8 (7)
Mig-Sed	85 ± 21 (85 ± 20)	25 (25)	100 (100)	11 (6)
MS+Spl	80 ± 11 (84 ± 10)	51 (73)	95 (99)	24 (12)
Konz	78 ± 10 (80 ± 10)	60 (52)	96 (94)	18 (18)
nK Ptx	83 ± 8 (80 ± 10)	69 (53)	93 (96)	29 (23)

Werte der Kontrollen in Klammern

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Den geringsten Anteil an nicht vitalen Spermatozoen wiesen die Methoden Ankonzentrieren und Stimulation mit Pentoxifyllin mit jeweils 78% nicht vitalen Spermatozoen nach Aufbereitung und Kryokonservierung auf. Nach Migration-Sedimentation und Kryokonservierung waren 85% der Spermatozoen nicht vital. Es muss allerdings darauf hingewiesen werden, dass für Migration-Sedimentation auch die Kontrollgruppe einen Anteil nicht vitaler Spermatozoen von 85% zeigte. Diese Tatsache gilt es auch bei der Interpretation der Ergebnisse der Aufbereitung Glaswolle zu berücksichtigen. Die Kontrollgruppen zeigten außer bei Ankonzentrieren niedrigere prozentuale Anteile an nicht vitalen Spermatozoen. Die hier bestimmten Werte lagen zwischen 73% und 85%.

3.3.2 Nicht vitale Spermatozoen nach Kryokonservierung bezogen auf 1 ml eingesetztes Nativejakulat

Für diesen Aspekt wurde die Anzahl der nicht vitalen Spermatozoen berechnet, die sich nach abgeschlossenen Aufbereitungsverfahren und Kryokonservierung ergaben. Durch diesen Wert wurde der Verlust einer Methode erfasst. Die Werte sind in Tabelle 3.15 dargestellt.

Tabelle 3.15:

Nicht vitale Spermatozoen nach Kryokonservierung bezogen auf 1 ml eingesetztes Nativejakulat

Methode	Mittelwert (x 10 ⁶) ± Std.Abw (x 10 ⁶)	Minimum (x 10 ⁶)	Maximum (x 10 ⁶)	Fallzahl
Nativ	1,119 ± 0,769	0,028	3,635	49
Underlay	0,389 ± 0,392 (1,389 ± 0,808)	0,022 (0,090)	1,768 (3,366)	18 (17)
Ptx	1,749 ± 0,895 (1,892 ± 0,873)	0,450 (0,966)	3,096 (3,364)	11 (6)
Ptx+Gw	0,227 ± 0,120 (1,756 ± 0,855)	0,064 (0,966)	3,760 (3,635)	7 (7)
Gw	0,220 ± 0,138 (1,291 ± 0,651)	0,040 (0,440)	0,420 (2,300)	8 (7)
Mig-Sed	0,026 ± 0,027 (1,286 ± 0,584)	0,003 (0,486)	0,792 (1,866)	11 (3)
MS+Spl	0,788 ± 0,100 (1,102 ± 0,530)	0,002 (0,192)	0,342 (1,936)	23 (10)
Konz	0,497 ± 0,466 (1,028 ± 0,736)	0,049 (0,070)	1,558 (2,240)	17 (15)

Werte der Kontrollen in Klammern

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Der Vergleich der Mittelwerte der einzelnen Aufbereitungen zeigt, dass den geringsten und damit besten Wert die Methode MS erbringt. Der sehr niedrige Wert wird insbesondere bei dieser Methode durch die nach abgeschlossener Aufbereitung stark reduzierte Spermatozoenkonzentration bedingt. Bei den Aufbereitungen wurde die ursprüngliche Spermatozoenkonzentration zugunsten motiler Spermatozoen zum Teil stark reduziert.

Das Erstellen einer vergleichenden Statistik war nicht zulässig, da die Werte nicht auf einen gemeinsamen Grundwert bezogen werden konnten. Möglich war nur die in Tabelle 3.15 enthaltene rein deskriptive Statistik.

3.4 Immotilität nach Kryokonservierung

Um die Effektivität einer Methode abschätzen zu können, wurde für jede Methode der Anteil an Fällen bestimmt, bei dem nach abgeschlossener Kryokonservierung keine motilen Spermatozoen mehr vorhanden waren. Diese Ergebnisse zeigt Tabelle 3.16.

Tabelle 3.16:

Prozentualer Anteil der Ejakulatproben mit vollständiger Immotilität nach Kryokonservierung

Methode	Anzahl	Gesamtzahl	Prozent
Nativ	24	69	39
Underlay	9 (4)	18 (18)	50 (22)
Ptx	4 (1)	11 (6)	36 (17)
Ptx+Gw	5 (2)	7 (8)	71 (25)
Gw	3 (4)	8 (8)	38 (50)
Mig-Sed	6 (5)	11 (6)	54 (83)
MS+Spl	8 (4)	24 (13)	33 (31)
Konz	7 (5)	18 (18)	39 (28)
nK Ptx	11 (9)	29 (23)	38 (39)

Werte der Kontrollen in Klammern

Nativ = Nativejakulat; Underlay = Aufbereitung mittels Underlay; Ptx = Stimulation mit Pentoxifyllin; Ptx+Gw = Stimulation mit Pentoxifyllin, anschließend Glaswollfiltration; Gw = Glaswollfiltration; Mig-Sed = Migration-Sedimentation; MS+Spl = Migration-Sedimentation, anschließend Zugabe von Seminalplasma; Konz = Ankonzentrieren; nK Ptx = nach Kryokonservierung Stimulation mit Pentoxifyllin.

Zahlen in Klammern geben die Werte der Kontrollgruppe an.

In den nativ kryokonservierten Proben zeigte sich nach dem Gefrier-/Auftauvorgang ein ähnlicher Anteil immotiler Spermatozoen wie nach Ankonzentrieren, nK Ptx und Gw. Bei den Methoden Underlay, Ptx+Gw und Mig-Sed zeigten mehr als 50% der Proben nach Kryokonservierung keine Motilität mehr. Bei den nativ belassenen Kontrollproben lag der Anteil fast immer deutlich geringer als bei den aufbereiteten Proben.

3.5 Messung von reaktiven Sauerstoffspezies

3.5.1 Spermatozoenkonzentration der Proben

Die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration der für diese Experimente eingesetzten Ejakulate betrug $1,66 \times 10^6/\text{ml}$. Durch den Vorgang des Ankonzentrierens wurde die Konzentration auf durchschnittlich $4,66 \times 10^6/\text{ml}$ angehoben.

3.5.2 Ergebnisse

Tabelle 3.17 zeigt die bei den Messungen erhobenen Ergebnisse.

Tabelle 3.17:

Ergebnisse der Messung reaktiver Sauerstoffspezies bei 9 Proben

Pat-Nr	Vit100	K-vit100	Impulse	K-impulse	Z x 10mio (x 10^6)	K-z x 10mio (x 10^6)
1	22750	57750	4131	6536	1,82	1,13
2	31200	78000	14277	49058	4,56	6,28
3	115200	273600	18900	30301	1,64	1,11
4	100800	266400	125	193	0,01	0,01
5	75000	117000	672	606	0,09	0,05
6	12920	33600	1 234	3138	0,96	0,93
7	96000	145350	19506	42220	2,03	2,90
8	25500	67200	1371	4252	0,54	0,63
9	17875	37600	375	1103	0,21	0,29
Mittelwert	55249	119611	6732	15267	1,32	1,48
±. Std.Abw	± 40969	± 92437	± 8326	± 19627	± 1,44	± 1,99

vit100 = Vitale Spermien in für die Messung eingesetzten 100 μl gewaschener Spermatozoensuspension

Impulse = Zahl der während der Messung abgegebenen Lichtimpulse

z*10Mio = Lichtimpulse bezogen auf 10^6 vitale Spermien; Angabe in 10^6

Werte sind jeweils für Nativejakulat im Vergleich zu ankonzentriertem Ejakulat angegeben. Die Werte für das ankonzentrierte Ejakulat sind mit „k“ versehen.

Die nativ belassenen Proben hatten durchschnittlich 55249 vitale Spermatozoen in einer 100 μl -Meßprobe gegenüber 119611 in den ankonzentrierten Proben. Diese Werte spiegeln die durchgeführte Ankonzentrierung wider. Die Zahl der Impulse liegt bei den ankonzentrierten Proben mit 15267 gegenüber 6732 Impulsen bei den Nativproben deutlich höher. Beide Werte

sind jedoch nach Henkel et al. [30] noch nicht erhöht, ebenso die Zahl der Impulse bezogen auf 10 Millionen vitale Spermatozoen.

3.5.3 Statistische Auswertung der Meßergebnisse

Vergleiche von Nativ und Konzentrat bezüglich der Sauerstoffradikale wurden mit Hilfe des Wilcoxon-Tests für paarige Stichproben durchgeführt. Die Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle dargestellt.

Tabelle 3.18:

Statistischer Vergleich zwischen den Methoden Nativ und Ankonzentrieren bezüglich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies

	X_{KONZ}	X_{NATIV}	Y_{KONZ}	Y_{NATIV}	Z_{KONZ}	Z_{NATIV}
Mittelwert ± Std.Abw.	7140	408	15267	6732	0,15	0,13
Minimum	634	259	193	125	0,007	0,0012
Maximum	19960	516	49058	19506	0,6289	0,4576
Ergebnis Wilcoxon-Test	P = 0,01		P = 0,01		P = 0,68	

X Konz = Anzahl der gemessenen Impulse; Methode Ankonzentrieren

X Nativ = Anzahl der gemessenen Impulse; Methode Nativ

Y Konz = korrigierter Wert der gemessenen Werte, Methode Ankonzentrieren

Y Nativ = korrigierter Wert der gemessenen Werte, Methode Nativ

Z Konz = Anzahl der Impulse bezogen auf ein vitales Spermatozoon, Methode Ankonzentrieren

Z Nativ = Anzahl der Impulse bezogen auf ein vitales Spermatozoon, Methode Nativ

Die statistische Auswertung der Messergebnisse anhand des Wilcoxon-Tests zeigt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zwischen nativ belassenen und ankonzentrierten Proben

4 Diskussion

4.1 Versuchsaufbau und Probenauswahl

Die Kryokonservierung von menschlichen Spermatozoen ist eine seit Jahrzehnten etablierte Methode zur Realisierung eines Kinderwunsches nach fertilitätsschädigenden Eingriffen [70,71]. Daneben gewinnt die Kryokonservierung zunehmend an Bedeutung beim Einsatz in der Sterilitätsbehandlung. Ejakulate von Patienten, bei denen aufgrund einer malignen Erkrankung eine Chemotherapie oder Radiatio notwendig ist, weisen häufig bereits vor Therapiebeginn eine eingeschränkte Qualität auf [16,17,42,71].

Seit Einführung der intrazytoplasmatischen Spermatozoeninjektion (ICSI) gibt es keine Einschränkungen der Ejakulatqualität mehr, die die Indikation für die Kryokonservierung limitieren [44,60]. Für ICSI werden nur wenige lebende Spermatozoen benötigt, die durch ihre Motilität identifiziert werden. Ejakulate mit schlechter Qualität besitzen jedoch eine verminderte Gefrierfähigkeit, d.h. weniger Spermatozoen überleben den Gefrier-/Auftauvorgang [73,74]. Bisher gibt es für die Gruppe der Patienten mit Oligozoospermie kein Standard-Protokoll zur Durchführung der Kryokonservierung mit vorheriger bzw. anschließender Aufbereitung, das der bekannten schlechten Kryotoleranz unter Berücksichtigung der ohnehin eingeschränkten Spermaqualität dieser Patientengruppe gerecht werden könnte [22,49,65,69,76,88].

Gerade für diese Patientengruppe ist für die Durchführung einer erfolgreichen assistierten Reproduktion die Anlage eines Kryospermadepts sinnvoll, da es durch intraindividuelle Schwankungen der Ejakulatqualität zum zeitweisen Auftreten einer Azoospermie mit Scheitern eines geplanten IVF- oder ICSI-Zyklus kommen kann [44,59].

Bei hochgradiger Oligozoospermie oder Kryptozoospermie kann es nach dem Gefrier-/Auftauvorgang schwierig sein, die wenigen lebenden Spermatozoen in einem relativen großen Volumen zu identifizieren. Vorherige Ankonzentrierung reduziert das Volumen für die Kryokonservierung und könnte dieses Problem lösen.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Kryokonservierung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie. Die in der Studie verwendeten Ejakulate stammen alle aus der andrologischen Ambulanz am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-

Universität Gießen. Bevor Ejakulate zu Studienzwecken freigegeben werden konnten, wurden erst alle medizinisch erforderlichen Untersuchungen durchgeführt. Hierdurch reduzierte sich das für die Studie zur Verfügung stehende Ejakulatvolumen erheblich. Deshalb konnte im Regelfall pro Ejakulat nur eine Aufbereitung durchgeführt werden. Die einzelnen Verfahren konnten so nicht direkt miteinander verglichen werden, was die Auswertung und nachfolgende Bewertung erschwerte. Durch Vergleich der Zielparameter ließen sich allerdings Trends erkennen.

Ein großes Problem bei der Auswertung der Ergebnisse stellten die stark unterschiedlichen Fallzahlen der einzelnen Verfahren dar. Bei 69 Ejakulaten konnte eine Kryokonservierung von Nativejakulat und aufbereiteter Probe durchgeführt werden. Bei einem kleinen Teil der Proben war die zusätzliche Kryokonservierung von unaufbereitetem Ejakulat aus Volumenmangel nicht möglich.

Derzeit erfolgt überwiegend eine Separation motiler von immotilen Spermatozoen nach abgeschlossenem Gefrier-/Auftauvorgang [27]. Alternativ kann es aber sinnvoller sein, die Ejakulate vor geplanter Kryokonservierung aufzubereiten, um qualitativ hochwertige Proben zu erhalten [12].

Die Spermatozoenqualität nach abgeschlossenem Gefrier-/Auftauvorgang wird durch unterschiedliche Faktoren beeinflusst, auf die im Verlauf noch weiter eingegangen werden soll. Das Kryoprotektivum wirkt sich aufgrund seiner Hyperosmolarität schädigend auf die Vitalität der Spermatozoen aus [1,12,50]. Die Kryokonservierung übt auf Spermatozoen physikalischen und chemischen Stress aus, der über einen Verlust spezieller Funktionen wie Einschränkungen der Motilität, aber auch der akrosomalen Reaktion die Fertilität beeinträchtigen kann [1]. Durch den Einfrier- und Auftauprozess kommt es zu intrazellulären Veränderungen der Osmolarität mit potentiell letalen Zellschäden [1,29,76].

4.2 Aufbereitungsmethoden

4.2.1 Glaswollfiltration

Für die Spermatozoenseparation bei Patienten mit Oligo- und oder Asthenozoospermie sind zahlreiche Methoden entwickelt worden. Hierzu gehören zum Beispiel die Dichtegradientenzentrifugation [51] und die Glaswollfiltration [63,67]. Mit Hilfe der

Glaswollfiltration wird im Vergleich zu der konventionellen Swim-up-Methode eine wesentlich höhere Anzahl motiler und damit potentiell fertiler Spermatozoen isoliert [81]. Dies ist insbesondere bei Patienten mit hochgradiger Oligozoospermie entscheidend.

Das Trennprinzip der Glaswollfiltration beruht auf der Eigenmotilität der Spermatozoen und der Filtrationswirkung der Glaswollfasern. Überwiegend vitale und motile Spermatozoen sind in der Lage, durch die Faserzwischenräume hindurch zu schwimmen und in das Filtrat zu gelangen. Langsam bewegliche oder immotile Spermatozoen werden ebenso wie Leukozyten, Erythrozyten und Zelldetritus durch die Glaswollfasern zurückgehalten. Im Vergleich zum Swim-up hat die Glaswollfiltration zwei wesentliche Vorteile: Durch die Filtration werden Leukozyten entfernt, und die Spermatozoen müssen nicht zentrifugiert werden. Die Glaswollfiltration senkt so den Anteil reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) [30,68]. Das erhaltene Filtrat enthält einen extrem hohen Anteil progressiv motiler und damit potentiell für die Fertilisation geeigneter Spermatozoen.

Der Einfluss reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) auf menschliche Spermatozoen wurde erstmals von McLeod 1943 [55] untersucht. Der Zusammenhang zwischen oxidativem Stress und männlicher Infertilität ist anerkannt [2,4,7]. Bei reaktiven Sauerstoffspezies handelt es sich um hochreaktive Moleküle (Hyperoxid, Wasserstoffperoxid und OH-Radikale) mit einem außerordentlich hohen Schädigungspotential. Hauptquelle sind Leukozyten, ein kleinerer Teil stammt aus beschädigten oder defekten Spermatozoen [5,6].

Die Membran humaner Spermatozoen besteht zu einem Großteil aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die sehr empfänglich für Oxidationsvorgänge sind. Die Zellen haben nur eine begrenzte Fähigkeit zur Reparatur der Membranen; zudem können sie selber ROS generieren. Seminalplasma und Spermatozoen enthalten antioxidative Faktoren [37]. Insbesondere bei gewaschenen Spermatozoen, denen Seminalplasma entzogen wurde, scheinen diese Faktoren eine Lipidoxidation jedoch nicht gänzlich verhindern zu können [52].

Im Extremfall kann bereits die mit dem Waschvorgang verbundene Zentrifugation bis zum vollständigen Verlust jeglicher Motilität der Spermatozoen führen. Der Grund hierfür liegt in der Übertragung der Radikale von geschädigten auf noch intakte Zellen, was durch die Zellkompaktierung beim Zentrifugieren wesentlich erleichtert wird. Zum anderen wirkt der Vorgang der Zentrifugation selbst durch mechanische Belastungen zellschädigend [53].

Dadurch kann es zu dramatischen Motilitätsverlusten sowie beeinträchtigter Fusion zwischen Spermatozoen und Oozyte kommen [4,6]. Deshalb wird mittels Aufbereitungsmethoden die möglichst rasche und schonende Trennung „geschädigter“ von „intakten“ Zellen angestrebt [3,57].

Durch die vergleichsweise geringe Effektivität führt die Glaswollfiltration aber häufig zum Verlust von Spermatozoen, was die Vorteile des gegenüber anderen Aufbereitungen schonenden Vorgehens relativieren kann [58].

Bei der vorliegenden Studie konnte die Glaswollfiltration nur bedingt erfolgreich eingesetzt werden. Die Hauptursache hierfür ist in der schlechten Qualität der eingesetzten Ejakulate zu sehen. Untersucht wurden Ejakulate mit einer maximalen Spermatozoenkonzentration von $5,0 \times 10^6/\text{ml}$, d.h. mit hochgradiger Oligozoospermie. Hinzu kommt, dass die Mehrzahl der eingesetzten Ejakulate auch hinsichtlich der Parameter Motilität und Vitalität von deutlich eingeschränkter Qualität waren. Die Ergebnisse legen den Schluss nahe, dass die Glaswollfiltration für Ejakulate mit hochgradiger Oligozoospermie zur Separation motiler von immotilen Spermatozoen vor Kryokonservierung nur begrenzt einsetzbar ist - etwa bei Ejakulaten mit einem hohen Prozentsatz motiler Spermatozoen.

4.2.2 Stimulation mit Pentoxifyllin

Motilität gilt als wichtiger Marker für die Fertilisationsfähigkeit von Spermatozoen [50,56,75]. Eine pharmakologisch induzierte Stimulation der Motilität kann die Fertilität verbessern [61,80]. Hierfür wurde vereinzelt der Phosphodiesterasehemmer Pentoxifyllin eingesetzt [20,56,61,78,80]. Seit längerem ist bekannt, dass Komponenten des Kallikrein-Kinin-Systems die Motilität nativer Spermatozoen stimulieren. Für Kryosperma wurde diese Wirkung vor mehr als 15 Jahren zunächst für Kallikrein und Koffein und wenig später auch für Pentoxifyllin bestätigt [11,41,72].

Pentoxifyllin gehört zur Gruppe der Methylxanthine und übt über Hemmung der cAMP-Phosphodiesterase einen stimulierenden Einfluss auf die Spermatozoenmotilität aus [25,75]. Der Anstieg von intrazellulärem cAMP nach Stimulation mit Pentoxifyllin ist einer der wichtigsten Gründe für die positiven Effekte auf die Motilität von Spermatozoen [66,83]. Deshalb wurde Pentoxifyllin in der Behandlung von Patienten mit Oligo- und oder

Asthenozoospermie eingesetzt [91]. Kontrollierte Studien zum Beweis der zunächst angenommenen besonders motilitätssteigernden Wirkung bei Ejakulaten mit Asthenozoospermie wurden jedoch nicht durchgeführt [52,78,90].

Zusätzlich wurde eine Verbesserung von „sperm motion characteristics“ im Sinne einer gesteigerten Progressivmotilität beschrieben, wodurch die Qualität von Ejakulaten gesteigert werden konnte [62,78,91]. Mehrfach hingewiesen wurde auf eine interindividuelle Schwankungsbreite des Ansprechens auf Pentoxifyllin; etwa 10% der Patienten sprechen nicht auf eine Behandlung an; dies scheint in vitro sowohl für Normo- als auch Oligozoospermie zu gelten [56,89].

Als Antioxidant kann Pentoxifyllin während des Gefrier-/Auftauvorgangs protektiv auf Spermatozoenmembranen wirken, so dass durch Zusatz von Pentoxifyllin vor geplanter Kryokonservierung ein höherer Anteil motiler Spermatozoen nach dem Auftauvorgang erzielt werden kann [18,82,89]. Gavella & Lipovac [26] wiesen darauf hin, dass Pentoxifyllin die Entstehung von ROS in menschlichen Spermatozoen reduzieren könnte. McKinney et al. [52] bestätigten dies. Sie erklärten das mit einem reduzierten oxidativen Metabolismus mit nachfolgender Reduktion der Produktion potentiell membranschädigender Superoxidanionen. Die antioxidativen Eigenschaften Pentoxifyllins stabilisieren auch die durch den Gefrier-/Auftauvorgang geschädigten akrosomalen Membranen, so dass bei gewünschter Fertilisation mehr akrosomal intakte Spermatozoen zur Verfügung stehen [24].

Der positive Effekt des Zusatzes von Pentoxifyllin vor Kryokonservierung scheint sich aber nicht ohne weiteres auf Ejakulate mit Oligozoospermie übertragen zu lassen. Insbesondere ließ sich bisher kein positiver Effekt im Rahmen der assistierten Reproduktion zeigen [80].

In einer 1992 erschienenen Studie untersuchten Köhn und Mitarbeiter an 35 Patienten, deren Ejakulate eine mittlere Spermatozoenkonzentration von $142 \times 10^6/\text{ml}$ aufwiesen, den Nutzen der Stimulation von Spermatozoen mit Pentoxifyllin nach Kryokonservierung [41]. Ziel dieser Studie war es, die Auftaumotilität von Ejakulaten herabgesetzter Qualität zu verbessern. Festgestellt wurde ein deutlicher motilitätsstimulierender Effekt von Pentoxifyllin auf Kryosperma, der allerdings auf etwa 30 Minuten nach dem Auftauen begrenzt war. Diese Ergebnisse unterstützten die von Yovich et al. [91] veröffentlichte Hypothese, dass

Pentoxifyllin intrazelluläre Energiereserven stimuliert und vorzeitig verbraucht. Durch Erhöhung der intrazellulären cAMP-Konzentration besteht die Gefahr, eine unphysiologische akrosomale Reaktion zu induzieren und so den als Folge des Gefrier-/Auftauvorganges unspezifisch induzierten degenerativen Verlust der akrosomalen Membran noch zu verstärken [41,92].

In der vorliegenden Arbeit wurde mit der in der klinischen Routine üblichen Konzentration von 1 mg Pentoxifyllin pro ml Lösung gearbeitet [89]. In dieser Konzentration hat Pentoxifyllin einen protektiven Einfluss gegenüber freien Sauerstoffradikalen [26,52,89].

Nach Stimulation mit Pentoxifyllin lag die Globalmotilität vor dem Einfrieren im Durchschnitt bei 37,3% und damit um fast 10% höher als die der unbehandelten Proben. Nach Kryokonservierung und Auftauvorgang konnten im Mittel nur noch 4,4% motile Spermatozoen gezählt werden, nur 2 der untersuchten Methoden zeigten geringere Werte (siehe 3.2). Unsere Ergebnisse zeigen, dass in der Subkategorie "Anzahl der motilen Spermatozoen pro eingesetztem Milliliter Ejakulat" die Ejakulate, die erst nach dem Auftauvorgang mit Pentoxifyllin stimuliert wurden, signifikant bessere Ergebnisse lieferten als alle anderen durchgeführten Methoden (vergleiche Tabelle 3.13). Keinen Nutzen brachten dagegen die Stimulation bereits vor der Kryokonservierung bzw. die Kombination von Stimulation mit Pentoxifyllin und anschließender Glaswollfiltration. Häufig sind die zuvor beschriebenen günstigen Auswirkungen auf die Spermatozoenmotilität nach dem Auftauvorgang nicht mehr nachweisbar [24].

Dies könnte die oben genannte These stützen, dass Pentoxifyllin intrazelluläre Energiereserven vorzeitig verbraucht. Insbesondere die durchgeführte Kombination der primären Stimulation mit Pentoxifyllin und anschließender Glaswollfiltration zeigte extrem schlechte Ergebnisse. Die motilitätssteigernden Effekte einer Stimulation mit Pentoxifyllin scheinen also nicht lang genug anzuhalten, um in Zusammenhang mit Aufbereitungsmethoden wirklich zu einer Anreicherung motiler Spermatozoen führen zu können.

4.2.3 Migration-Sedimentation

Die Methode der Migration-Sedimentation hat sich bei der Aufbereitung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie oder Kryptozoospermie vor Methoden der assistierten

Reproduktion bewährt. Durch die Aufbereitung können Suspensionen mit einem sehr hohen Prozentsatz motiler Spermatozoen erhalten werden. Nachteil dieser Methode ist das sehr geringe Volumen, das nach abgeschlossener Aufbereitung noch zur Verfügung steht. Inzwischen werden durch Etablierung von ICSI nur noch einzelne vitale Spermatozoen benötigt. Progressiv-Motilität ist für den Erfolg der Methode keine zwingende Voraussetzung mehr. Da aber auch für ICSI bevorzugt morphologisch normale, progressiv-motile Spermatozoen ausgewählt werden, scheint die Migration-Sedimentation dennoch vor geplanter ICSI sinnvoll. Darüber hinaus ist zu bedenken, dass gerade in der vorliegenden Arbeit mit Ejakulaten stark eingeschränkter Qualität gearbeitet wurde. Das Auffinden vitaler Spermatozoen wird bereits durch die geringe Quantität deutlich erschwert. Kryokonservierung motiler Spermatozoen in hochkonzentrierter Form bietet den Vorteil, nach dem Auftauen vitale Spermatozoen leichter auffinden zu können.

Durch die Zentrifugation zu Beginn der Aufbereitung wird ein erheblicher mechanischer Stress auf die Spermatozoen ausgeübt. Die erhöhte Spermatozoenkonzentration im Pellet kann anschließend eine weitere zelluläre Schädigung durch Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies begünstigen [14]. So sind die Spermatozoen vor der eigentlichen Kryokonservierung - auch durch die zeitliche Dauer der Methode - erheblichen Belastungen ausgesetzt. Vor diesem Hintergrund ist das schlechte Ergebnis dieser Methode zu erklären. Hingewiesen werden muss jedoch darauf, dass gerade die in der Migration-Sedimentation eingesetzten Ejakulate von allen Gruppen die schlechtesten Ausgangswerte aufwiesen.

Durch die Produktion reaktiver Sauerstoffradikale können Aufbereitungsverfahren Spermatozoen schädigen [3]. Seminalplasma wird aufgrund antioxidativer Faktoren ein protektiver Effekt auf die Membran von Spermatozoen zugeschrieben [9,10,52,53]. Einem Teil der mit Migration-Sedimentation aufbereiteten Proben wurde deshalb vor der Kryokonservierung im Rahmen der Ankonzentrierung entzogenes Seminalplasma wieder zugesetzt. In einer 1992 erschienen Studie beschrieben Iwasaki et al. [33], dass Waschvorgänge durch wiederholte Zentrifugation den Anteil reaktiver Sauerstoffspezies um das 20- bis 50fache im Vergleich zur unbehandelten Probe erhöhen, während Zentrifugationsvorgänge ohne Entfernung des Seminalplasmas die ROS-Level zum Teil erniedrigten. Dies stützt die These des protektiven Effekts von Seminalplasma gegenüber der Bildung von ROS [33,88].

In der vorliegenden Arbeit findet sich bei den Proben, denen nach Migration-Sedimentation Seminalplasma zugegeben wurde, ein vollständiger Verlust der Motilität nach Kryokonservierung in 33% der Fälle. Die Gruppe der nur mit Migration-Sedimentation aufbereiteten Ejakulate zeigt demgegenüber einen Anteil von 54% der Fälle mit vollständigem Verlust der Motilität nach Kryokonservierung. Dieses Ergebnis scheint die Theorie des protektiven Effektes von Seminalplasma auf die Spermatozoen zu bestätigen.

4.2.4 Underlay

Die Underlay-Methode ist eine Modifikation der Swim-up-Methode. Für einen Swim-up werden die Spermatozoen zunächst durch Zentrifugation gewaschen. Anschließend müssen die hochmotilen Spermatozoen aus dem Pellet entgegen der Schwerkraft in das überschichtete Medium schwimmen. Auf diese Weise erhält man eine Fraktion hochmotiler Spermatozoen. Nachteil des Swim-up ist die mögliche im Zusammenhang mit der Zentrifugation auftretende Schädigung der Spermatozoen durch physikalische Kräfte und Freisetzung reaktiver Sauerstoffspezies.

Der Underlay kann als abgewandelte Form des Swim-up für Ejakulate mit Oligozoospermie verstanden werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind jedoch als wenig zufriedenstellend einzustufen. Trotz Verzicht auf Zentrifugationsvorgänge und der Reduktion der zu überwindenden Strecke wurden mit dieser Methode bei allen erhobenen Parametern die schlechtesten Ergebnisse erzielt. Bedingt sein kann dies zum einen durch die Dauer der Aufbereitung, zum anderen durch die schlechte Qualität der eingesetzten Proben. Da die verwendeten Ejakulate eine durchschnittliche Motilität weit unter dem Normbereich (50%) hatten, scheint der Einsatz einer Aufbereitungsmethode, die Motilität zwingend voraussetzt, verfehlt.

Das schlechte Ergebnis des Underlay bestätigt somit die ebenfalls schlechten Ergebnisse anderer Methoden, die auf Ausnutzung der Spermatozoenmotilität beruhen.

4.2.5 Ankonzentrieren durch Zentrifugation

Ausgangspunkt für diese Methode war eine Publikation, in der Kobayashi et al. [40] die Kryokonservierung von zuvor ankonzentrierten Ejakulaten beschrieben und über positive

Resultate berichteten. Durch Ankonzentrieren der Ejakulate von 32 Probanden mit Normozoospermie konnte die mittlere Spermatozoenkonzentration von 41 auf $68 \times 10^6/\text{ml}$ erhöht werden. Die Autoren gingen davon aus, dass die Methode des Ankonzentrierens insbesondere für Patienten mit Oligozoospermie günstig sei, um eine ausreichende Anzahl an Spermatozoen zu erhalten, die dann für Verfahren der assistierten Reproduktion, z.B. ICSI, genutzt werden könnten.

Die in der eigenen Studie erhobenen Ergebnisse an 18 Patienten scheinen diese Einschätzung an Ejakulaten mit stark reduzierter Qualität zu bestätigen. Nach Kryokonservierung zeigten die ankonzentrierten Ejakulate gegenüber allen anderen Aufbereitungen die höchste Konzentration motiler Spermatozoen pro μl . Im Vergleich zu den unbehandelten kryokonservierten Ejakulaten gab es keine Unterschiede hinsichtlich prozentualer Motilität und Immotilität nach Kryokonservierung.

Bei einem relativ hohen Anteil nicht vitaler Spermatozoen nach abgeschlossenem Versuch stellte sich die Frage, ob dies durch eine übermäßige Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen während des Zentrifugationvorganges bedingt sein könnte (siehe auch Abschnitt 4.2.1 sowie 4.2.2). Aus diesem Grund wurde ein Folgeversuch mit neun Ejakulaten durchgeführt, bei denen jeweils im nativ belassenen und im durch Zentrifugation ankonzentrierten Ejakulat die Freisetzung von freien Sauerstoffradikalen gemessen wurde.

Die Auswertung der Ergebnisse bezüglich der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies zeigte zwar für die Gruppe der ankonzentrierten Ejakulate höhere Werte als für die der Nativejakulate. Der Normbereich wurde jedoch nicht überschritten. Der Unterschied zwischen beiden Gruppen war nicht signifikant. Zudem konnten gerade mit der Methode des Ankonzentrierens nach abgeschlossener Kryokonservierung die besten Ergebnisse hinsichtlich der Anzahl motiler Spermatozoen pro μl erzielt werden (siehe 3.2.2). Um den Einfluss der ROS auf die Kryokonservierung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie beurteilen zu können, wäre die Messung von ROS nach abgeschlossener Kryokonservierung bei verschiedenen Aufbereitungsmethoden notwendig.

Der entscheidende Vorteil der Methode des Ankonzentrierens gegenüber sämtlichen anderen durchgeführten Verfahren ist die höhere Konzentration motiler Spermatozoen, bedingt durch Zentrifugation und damit erfolgte Zellkompaktierung. Das Risiko der Spermatozoen,

aufgrund der Zellkompaktierung durch reaktive Sauerstoffspezies geschädigt zu werden, wird durch Resuspendierung des Pellets in Seminalplasma reduziert, weil die Spermatozoen antioxidative und membranstabilisierende Faktoren des Seminalplasmas zurückerhalten [14,37]. Die potentiell negativen Folgen der Zellkompaktierung werden so zumindest abgeschwächt.

Da keine Zellsortierung oder Separation erfolgen, ist das Verfahren schnell und der Zellverlust klein. Die in der eigenen Studie erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass bei hochgradiger Oligozoospermie die Konzentration von Ejakulaten vor geplanter Kryokonservierung zu günstigeren Ergebnissen führen kann als die Kryokonservierung unbehandelter Ejakulate.

4.3 Betrachtung der Zielparameter

4.3.1 Spermatozoenkonzentration

Das Verfahren der Migration-Sedimentation dient speziell der Aufbereitung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie oder Kryptozoospermie vor Verfahren der assistierten Reproduktion und wird insbesondere vor geplanter intrazytoplasmatischer Spermatozoeninjektion (ICSI) eingesetzt [77]. Die Ejakulate dieser Gruppe zeigten vor Versuchsbeginn mit durchschnittlich 1855 Spermatozoen pro μl die deutlich niedrigste Ausgangsdichte aller Gruppen. Bei höherer Spermatozoenkonzentration finden Glaswollfiltration und Swim-up Anwendung. Die Glaswollfiltration ist einfacher durchzuführen und für die Spermatozoen schonender als die Migration-Sedimentation, da sie kürzer dauert (15 Minuten vs. 60 Minuten bei Migration-Sedimentation) und keine Zentrifugationsvorgänge notwendig sind, die u.a. physikalischen Stress für die Spermatozoen bedeuten. Voraussetzung zur erfolgreichen Durchführung eines Swim-up ist eine hohe Progressivmotilität, so dass dieses Verfahren in der vorliegenden Arbeit aufgrund des besonderen Kollektivs keine Anwendung fand.

Der Vergleich der Ergebnisse nach den Aufbereitungen vor der Kryokonservierung zeigte ein zentrales Problem: Gelang es mit Hilfe eines Aufbereitungsverfahrens die motile Fraktion gegenüber dem Ausgangsejakulat deutlich zu erhöhen, verringerte sich die Spermatozoenzahl pro μl deutlich. So konnte mit Hilfe der Migration-Sedimentation zwar ein Anteil von 43% motiler Spermatozoen an der Gesamtzahl erreicht werden. Dieses ausgezeichnete Ergebnis

wurde jedoch durch die geringe Zahl von Spermatozoen pro μl relativiert: nach Migration-Sedimentation betrug die durchschnittliche Konzentration nur noch 349 Spermatozoen pro μl . Im Vergleich dazu betrug die durchschnittliche Spermatozoenkonzentration im nicht aufbereiteten Ejakulat 2736 pro μl .

Eine stark verdünnte Suspension erschwert bei Verfahren der assistierten Reproduktion das Auffinden von motilen bzw. vitalen, für eine Mikroinjektion geeigneten Spermatozoen. Andererseits kann es auch von Vorteil sein, wenn eine Probe zwar nur noch wenige, dafür aber hochmotile Spermatozoen enthält.

Die eigenen Ergebnisse lassen die Methode des Ankonzentrierens als vergleichbar günstig gegenüber unaufbereitetem Ejakulat erscheinen. Alle anderen Methoden führten zu gegenüber den unbehandelten Proben schlechteren Ergebnissen. Hauptproblem hierbei scheint die Kryokonservierung zu sein. Es ist bekannt, dass Ejakulate mit Oligozoospermie den Gefrier-/Auftauvorgang deutlich schlechter überstehen als solche mit Normozoospermie [73,74]. Aufgrund der eigenen Ergebnisse wäre bei ausreichendem Material die Kryokonservierung von ankonzentrierten Proben sinnvoll.

4.3.2 Immotilität nach Kryokonservierung

Neben dem Parameter der Spermatozoenkonzentration war für die Bewertung hinsichtlich des Einsatzes in der andrologischen Praxis auch der Anteil an Fällen wichtig, bei denen nach abgeschlossener Kryokonservierung keine motilen Spermatozoen mehr gefunden werden konnten. Da Motilität als ein Marker für Fertilität gilt, werden auch für ICSI bevorzugt motile Spermatozoen benutzt [32,56,75].

Unaufbereitete kryokonservierte und aufgetaute Ejakulate zeigten in 24 von 69 Fällen oder 39,4% keine motilen Spermatozoen mehr. Auch die meisten Aufbereitungen wiesen ähnliche Werte auf. Hervorzuheben in diesem Zusammenhang sind jedoch die Aufbereitungen Glaswollfiltration und Migration-Sedimentation: 50% der Proben, die mit Glaswollfiltration aufbereitet worden waren und 54,5% der mit Migration-Sedimentation aufbereiteten Proben zeigten keine motilen Spermatozoen mehr nach Kryokonservierung. Verantwortlich für dieses schlechte Ergebnis bei Migration-Sedimentation könnte neben dem zeitlich relativ langen Aufbereitungsverfahren auch der Entzug des Seminalplasmas sein.

4.4 Zusammenfassende Bewertung der Methoden

Die vorliegende Arbeit untersuchte die Kryokonservierung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie. Zentrale Frage war, ob zuvor aufbereitetes Ejakulat dem unaufbereiteten Ejakulat hinsichtlich der Kryotauglichkeit überlegen war. Ejakulate mit geringer Spermatozoenkonzentration und Ausgangsmotilität werden durch die notwendigen Kryoprotektiva sowie den Gefrier-/Auftauvorgang häufig so stark beeinträchtigt, dass eine Lagerung vor Etablierung moderner Methoden der assistierten Reproduktion nicht sinnvoll erschien. Gerade junge Männer mit Hodentumoren oder Morbus Hodgkin weisen schon vor Therapiebeginn aus verschiedenen Gründen eine eingeschränkte Ejakulatqualität auf [31,41]. Durch den Verlust vitaler Spermatozoen wird der Einsatz der Kryokonservierung in der assistierten Reproduktion entscheidend beeinträchtigt [21,22].

In der vorliegenden Studie wurde die Kryokonservierung von Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie nach verschiedenen Aufbereitungsmethoden untersucht. Ziel der Studie war, eine Aussage darüber machen zu können, ob und welche Aufbereitung vor Kryokonservierung sinnvoll erscheint.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Kryokonservierung von unaufbereitetem Sperma auch für Ejakulate mit hochgradiger Oligozoospermie die Standardmethode ist. Bei den Aufbereitungen haben nur zwei der acht Methoden vergleichbar gute oder bessere Ergebnisse gezeigt. Dies sind die Methode des Ankonzentrierens vor Kryokonservierung und die Stimulation mit Pentoxifyllin nach abgeschlossener Kryokonservierung. Überraschend mögen die schlechten Ergebnisse der hochselektiven Aufbereitungsmethoden erscheinen. Gerade diese Methode waren vor Studienbeginn favorisiert worden. Die Glaswollfiltration ist aufgrund der sehr geringen Ausgangskonzentrationen bei Ejakulaten mit hochgradiger Oligozoospermie nicht sinnvoll. Migration-Sedimentation ist eine geeignete Methode, wenn direkt nach abgeschlossener Aufbereitung Methoden der assistierten Reproduktion durchgeführt werden sollen. Gefrier- und Auftauvorgänge werden jedoch von Spermatozoen nach Durchlaufen des zeitlich lange dauernden Aufbereitungsverfahrens der Migration-Sedimentation nicht mehr toleriert; dies könnte im Zusammenhang stehen mit einer Erschöpfung intrazellulärer Energiereserven. Aus Tierversuchen ist ebenfalls bekannt, dass übermäßiger mechanischer Stress, wie z.B. durch Zentrifugationsvorgänge verursacht, von Spermatozoen nur bedingt toleriert wird [1,38].

Sinnvoll scheinen also Methoden zu sein, die keine lange Zeit beanspruchen und die Spermatozoen möglichst wenig traumatisieren. Die Methode des Ankonzentrierens erfüllt diese Bedingungen und bietet darüber hinaus den Vorteil, dass die vitalen Spermatozoen in den Proben nach abgeschlossenem Gefrier-/Auftauvorgang leicht auffindbar sind. Endgültige Aussagen können mit der vorliegenden Studie aufgrund der zu geringen Fallzahl nicht gemacht werden. Eine Korrelation mit anschließenden Schwangerschaftsraten erscheint sinnvoll. Dies sollte in weiterführenden Studien untersucht werden.

5 Literatur

1. Agca Y, Critser JK (2002) Cryopreservation in assisted reproduction. *Semin Reprod Med* 20: 15-23
2. Aitken RJ, Clarkson JS (1987) Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 459-469
3. Aitken RJ, Clarkson JS (1988) Significance of reactive oxygen species and anti-oxidants in defining the efficacy of sperm preparation techniques. *J Androl* 9: 367-376
4. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S (1989) Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation and human sperm function. *Biol Reprod* 40: 183-197
5. Aitken RJ, Clarkson JS, Hargreave TB, Irvine DS, Wu FCW (1989) Analysis of the relationship between defective sperm function and the generation of reactive oxygen species in case of oligozoospermia. *J Androl* 10: 214-220
6. Aitken JG, West KM (1990) Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leukocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl* 13: 433-451
7. Alvarez JG, Storey BT (1992) Evidence for increased lipid peroxidative damage and loss of superoxide dismutase activity as a mode of sublethal cryodamage to human sperm during cryopreservation. *J Androl* 13: 232-241
8. Alvarez JG, Storey BT (1993) Evidence that membrane stress contributes more than lipid peroxidation to sublethal cryodamage in cryopreserved human sperm: Glycerols and other polyols as sole cryoprotectant. *J Androl* 14: 199-208
9. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT (1987) Spontaneous lipid peroxidation and the production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. *J Androl* 8: 338-348
10. Armstrong JS, Rajasekaran M, Hellstrom WJ, Sikka SC (1998) Antioxidant potential of serum albumin: Role in assisted reproductive technology. *Hum Reprod* 19: 412-419
11. Barkay J, Zuckerman H, Sklan D, Gordon S (1977) Effect of caffeine on increasing the motility of frozen human sperm. *Fertil Steril* 28: 175-177
12. Barthelemy C, Royere D, Hammah S, Lebos C, Tharanne MJ, Lansanc J (1990) Ultrastructural changes in membranes and acrosome of human sperm during cryopreservation. *Arch Androl* 25: 29-40
13. Behrmann SJ, Sawada Y (1966) Heterologous and homologous inseminations with human semen frozen and stored in a liquid-nitrogen refrigerator. *Fertil Steril* 17: 457-466

14. Bongso A, Jarina AK, Ho J, Ng SC, Ratnam SS (1993) Comparative evaluation of three sperm-washing methods to improve sperm concentration and motility in frozen-thawed oligozoospermic and normozoospermic samples. *Arch Androl* 31: 223-230
15. Bosman E, du Toit D, Wessels PH, Bornman MS, du Plessis DJ (1994) Sperm adenosine triphosphate concentrations before and after freezing as a marker of cryolysis. *Arch Androl* 33: 7-10
16. Botchan A, Hauser R, Gamzu R, Yogev L, Lessing JB, Paz G, Yavetz H (1997a) Sperm quality in Hodgkin's disease versus non-Hodgkin's lymphoma. *Hum Reprod* 12: 73-76
17. Botchan A, Hauser R, Yogev L, Gamzu R, Paz G, Lessing JB, Yavetz H (1997b) Testicular cancer and spermatogenesis. *Hum Reprod* 12: 755-758
18. Brennan AP, Holden CA (1995) Pentoxifylline-supplemented cryoprotectant improves human sperm motility after cryopreservation. *Hum Reprod* 10: 2308-2312
19. Bunge RG, Sherman JK (1953) Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. *Nature* 172: 767
20. Calogero AE, Fishel S, Hall J, Ferrara E, Vicari E, Green S, Hunter A, Burello N, Thornton S, D'Agata R (1998) Correlation between intracellular cAMP content, kinematic parameters and hyperactivation of human spermatozoa after incubation with pentoxifylline. *Hum Reprod* 13: 911-915
21. Centola GM, Raubertas RF, Mattox JH (1992) Cryopreservation of human sperm. Comparison of cryoprotectants, sources of variability and prediction of post-thaw. *J Androl* 13: 283-288
22. Cohen J, Felten P, Zeilmarker GH (1981) In vitro fertilization capacity of fresh and cryopreserved human spermatozoa: A comparative study of freezing and thawing procedures. *Fertil Steril* 36: 356-362
23. Critser JK, Huse-Benda AR, Aaker DV, Arneson BW, Ball GD (1988) Cryopreservation of human spermatozoa. III. The effect of cryoprotectants on motility. *Fertil Steril* 50: 314-320
24. Esteves SC, Sharma RK, Thomas AJ, Agarwal A (1998) Cryopreservation of human spermatozoa with pentoxifylline improves the post-thaw agonist-induced acrosome reaction rate. *Hum Reprod* 13: 3384-3389
25. Garbers DL, Lust WD, First NL, Lardy HA (1971) Effect of phospho-diesterase inhibitors and cyclic nucleotides on sperm respiration and motility. *Biochemistry* 10: 1825-1831
26. Gavella M, Lipovac V (1991) Effect of pentoxifylline on experimentally induced lipid peroxidation in human spermatozoa. *Int J Androl* 17: 308-313
27. Graczykowski JW, Siegel MS (1991) Motile sperm recovery from fresh and frozen-thawed ejaculates using a swim-up procedure. *Fertil Steril* 55: 841-843

28. Grizard G, Lombard-Vignon N, Boucher D (1992) Changes in carnitine and acetylcarnitine in human semen during cryopreservation. *Hum Reprod* 7: 1245-1248
29. Hammerstedt RH, Graham JK, Nolan JP (1990) Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J Androl* 11: 73-88
30. Henkel R, Ichikawa T, Sanchez R, Miska W, Ohmori H, Schill WB (1997) Differentiation of ejaculates showing reactive oxygen species production by spermatozoa or leukocytes. *Andrologia* 29: 295-301
31. Höppner W, Reinel D, Hartmann M (1986) Untersuchungen zur Fertilität von Patienten mit malignen Hodentumoren zum Zeitpunkt der Orchidektomie. *Andrologia* 18: 398-405
32. Husnar G, Willetts M, Corrales M (1990) Hyaluronic acid improves retention of sperm motility and velocity in normospermic and oligospermic specimens. *Fertil Steril* 54: 1127-1134
33. Iwasaki A, Gagnon C (1992) Formation of reactive oxygen species in spermatozoa in infertile patients. *Fertil Steril* 57: 409-416
34. Kaden R, Donnerhack A, Katzorke T (1983) Spermadeponierung in zentraler Kryosperma-Bank. *Fortschr Med* 101: 1322-1326
35. Kaden R, Grossgebauer K, Lübke F, Rohloff D, Sperling K (1986) Standardisierte Humansperma-Kryokonservierung. *Akt Dermatol* 12: 95-99
36. Kaden R, Katzorke T, Propping D, Klippel KF (1986) Kallikrein als Zusatz zum Kryosperma. In: Schill WB, Bollmann W (Hrsg) *Spermakonservierung, Insemination, In-vitro-Fertilisation*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore: 92-96
37. Kanwar KC, Yanagimachi R, Lopata A (1979) Effects of human seminal plasma on the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Fertil Steril* 31: 321-327
38. Katkov II, Mazur P (1998) Influence of centrifugation regimes on motility, yield, and cell associations of mouse spermatozoa. *Androl* 19: 232-241
39. Keel BA, Webster BW, Roberts DK (1987) Effect of cryopreservation on the motility characteristics of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 81: 213-220
40. Kobayashi T, Kaneko S, Hara I, Park YJ, Sato H, Ohno T, Nozawa S (1991) Concentrating human sperm before cryopreservation. *Andrologia* 23: 25-28
41. Köhn FM, Henkel R, Schill WB (1993) Pentoxifyllin stimuliert die Motilität von Spermatozoen nach Kryokonservierung. *Fertilität* 9: 79-84
42. Köhn FM, Schill WB (1988) Kryospermabank München – Zwischenbilanz 1974-1986. *Hautarzt* 39: 91-96
43. Kuber W, Lunglmayr G, Seitz W, Grauhoff H, Weißbach L (1980) Fertilität bei Patienten mit Seminom des Hodens. *Urologe A* 19: 272-275

44. Lahav-Baratz S, Rothschild E, Grach B, Koifman M, Shiloh H, Ishai D, Dirnfeld M (2002) The value of sperm pooling and cryopreservation in patients with transient azoospermia or severe oligoasthenoteratozoospermia. *Hum Reprod* 17: 157-160
45. Lin MH, Morshedi M, Srisombut C, Nassar A, Oehninger S (1998) Plasma membrane integrity of cryopreserved human sperm: An investigation on the results of the hypoosmotic swelling test, the water test, and eosin-Y staining. *Fertil Steril* 70: 1148-1155
46. Lopata A, Patullo MJ, Chang A, James B (1976) A method for collecting motile spermatozoa from human semen. *Fertil Steril* 27: 677-684
47. Lucena E, Lucena C, Gomez M, Ortiz JA, Ruiz J, Arango A, Diaz C, Beuermann C (1989) Recovery of motile sperm using the migration-sedimentation technique in an in-vitro fertilization-embryo transfer programme. *Human Reprod* 42: 163-165
48. Mack SR, Zaneveld LJ (1987) Acrosomal enzymes and ultrastructure of unfrozen and cryotreated human spermatozoa. *Gamete Res* 18: 375-383
49. Mahadevan MM, Trounson AO (1983) Effect of cryoprotective media and dilution methods on the preservation of human spermatozoa. *Andrologia* 15: 355-366
50. Mahadevan MM, Trounson AO (1984) Relationship of fine structure of sperm head to fertility of frozen human sperm. *Fertil Steril* 41: 287-293
51. Mathieu C, Mein M, Lornage J, Li JG, Guerin JF (1990) Effect of spermatozoa selection on a simplified percoll gradient in case of astheno-zoospermia. *Andrologia* 22: 467-471
52. McKinney KA, Lewis SE, Thompson W (1996a) The effects of pentoxifylline on the generation of reactive oxygen species and lipid peroxidation in human spermatozoa. *Andrologia* 28: 15-20
53. McKinney KA, Lewis SE, Thompson W (1996b) Reactive oxygen species generation in human sperm: Luminaol and lucigenin chemiluminescence probes. *Arch Androl* 36: 119-125
54. McLaughlin EA, Ford WC, Hull MG (1992) Motility characteristics and membrane integrity of cryopreserved human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 95: 527-534
55. McLeod J (1943) The role of oxygen in the metabolism and motility of human spermatozoa. *Am J Physiol* 138: 512-518
56. Moohan JM, Winston RML, Lindsay KS (1993) Variability of human sperm response to immediate and prolonged exposure to pentoxifylline. *Hum Reprod* 8: 1696-1700
57. Mortimer D (1991) Sperm preparation techniques and iatrogenic failures of in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 6: 173-176
58. Ohashi K, Saji F, Wakimoto A, Kato M, Tsutsui T, Tanizawa O (1992) Preparation of oligozoospermic and/or asthenozoospermic semen for intrauterine insemination using the SpermPrep[®] semen filtration column. *Fertil Steril* 57: 866-870

59. Ossenbuhn S (1998) Exogenous influences on human fertility: Fluctuations in sperm parameters and results of in-vitro fertilization coincide with conceptions in the normal population. *Hum Reprod* 13: 2165-2171
60. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC (1992) Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet* 304: 17-18
61. Pang SC, Chan PJ, Lu A (1993) Effects of pentoxifylline on sperm motility and hyperactivation in normozoospermic and normokinetic semen. *Fertil Steril* 60: 336-343
62. Paul M, Sumpter JP, Lindsay KS (1995) Action of pentoxifylline directly on semen. *Hum Reprod* 10: 354-359
63. Paulson JD, Polakoski KL (1977) A glass wool column procedure for removing extraneous material from the human ejaculate. *Fertil Steril* 28: 178-181
64. Polge C, Smith AU, Parkes AS (1949) Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperature. *Nature* 164: 666-667
65. Prins GS, Weidel L (1986) A comparative study of buffer systems as cryoprotectants for human spermatozoa. *Fertil Steril* 46: 147-149
66. Rees JM, Ford WCL, Hull MGR (1990) Effect of caffeine and of pentoxifylline on the motility and metabolism of human spermatozoa. *J Reprod Fertil* 90: 147-156
67. Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JPW, Zanefeld LJ (1989) Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 51: 685-690
68. Sánchez R, Concha M, Ichikawa T, Henkel R, Schill WB (1996) Glass wool filtration reduces reactive oxygen species by elimination of leukocytes in oligospermic patients with leukocytospermia. *J Assist Reprod Gent* 13: 489-494
69. Sawetawan C, Bruns ES, Prins GS (1993) Improvement of post-thaw sperm motility in poor quality human semen. *Fertil Steril* 60: 706-710
70. Schill WB (1972) Humane Spermakonservierung und therapeutische Ausblicke. *Hautarzt* 23: 525-530
71. Schill WB (1987) Beratung des Hodentumorpatienten aus andrologischer Sicht. *Fertilität* 3: 12-16
72. Schill WB, Pritsch W, Preissler G (1979) Effect of caffeine and kallikrein on cryo-preserved human spermatozoa. *Int J Fertil* 24: 27-32
73. Schill WB, Töpfer-Petersen E, Hoffmann R, Michalopoulos M, Rübekeil H (1986) Untersuchungen zur Schädigung von Kryosperma. In: Schill WB, Bollmann W (Hrsg) *Spermakonservierung, Insemination, In-vitro-Fertilisation*. Urban und Schwarzenberg, München Wien Baltimore: 35-50

74. Schill WB, Trotnow S (1984) Verwendung von Kryopserma für die In-vitro-Fertilisation (IVF). *Hautarzt* 35: 313-315
75. Schoenfeldt C, Amelar RD, Dubin L (1975) Stimulation of ejaculated human spermatozoa by caffeine. *Fertil Steril* 26: 158-161
76. Srisombut C, Morshedi M, Lin MH, Nassar A, Oehninger S (1998) Comparison of various methods of processing human cryopreserved-thawed semen samples. *Hum Reprod* 13: 2151-2157
77. Téa NT, Jondet M, Scholler R (1983) Procédé d'isolement des spermatozoïdes mobiles du sperm humain par la méthode de migration-sédimentation. *Pathol Biol* 31: 688-690
78. Tesarik J, Thébault A, Testart J (1992) Effect of pentoxifylline on sperm movement characteristics in normozoospermic and asthenozoospermic specimens. *Hum Reprod* 7: 1257-1263
79. Tournaye H, Camus M, Goossens A (1995) Recent concepts in the management of infertility because of non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod* 10: 115-119
80. Tournaye H, Janssens R, Verheyen G, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem AC (1994) An indiscriminate use of pentoxifylline does not improve in-vitro fertilization in poor fertilizers. *Hum Reprod* 9: 1289-1292
81. Van der Ven HH, Jeyendran RS, Al-Hasani S, Tünnerhoff A, Hoebbel K, Diedrich K, Krebs D, Perez-Pelaez M (1988) Glass wool column filtration of human semen: Relation to swim-up procedure and outcome of IVF. *Hum Reprod* 3: 85-87
82. Wang R, Sikka SC, Veeraragavan K, Bell M, Hellstrom MD (1993) Platelet activating factor and pentoxifylline as human sperm cryoprotectants. *Fertil Steril* 60: 711-715
83. Ward A, Clissold SP (1987) Pentoxifylline – a review of its therapeutic efficacy. *Drugs* 34: 50-97
84. Weißbach L, Bredefeld EA, Seeber S (1985) Hodentumoren: Frühzeitige Diagnose und stadiengerechte Therapie sichern den Erfolg. *Dtsch Ärztebl* 82: 1340-1350
85. WHO (1993) Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulats und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion. Springer-Verlag, Berlin
86. Yavetz H, Hauser R, Yogev L, Botchan A, Lessing JB, Homonnai ZT, Paz G (1995) Advanced methods for evaluation of sperm quality. *Andrologia* 27: 31-35
87. Yener C, Mathur S, Parent B (1990) Comparison of two sperm preparation techniques using automated sperm motion analysis: Migration-sedimentation versus swim-up. *Arch Androl* 25: 17-20
88. Yogev L, Gamzu R, Paz G, Kleiman S, Botchan A, Hauser R, Yavetz H (1999) Pre-freezing sperm preparation does not impair thawed spermatozoa binding to the zona pellucida. *Hum Reprod* 14: 114-117

89. Yovich JL (1993) Pentoxifylline: Actions and applications in assisted reproduction. Hum Reprod 8: 1786-1791
90. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL (1988) Preliminary results using pentoxifylline in a pronuclear stage tubal transfer (PROST) program for severe male factor infertility. Fertil Steril 50: 179-181
91. Yovich JM, Edirisinghe WR, Cummins JM, Yovich JL (1990) Influence of pentoxifylline in severe male factor infertility. Fertil Steril 53: 715-722
92. Zaneveld LJ, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR (1991) Human sperm capacitation and the acrosome reaction. Hum Reprod 6: 1265-1274

6 Zusammenfassung

Die Kryokonservierung ist eine etablierte Methode zur Lagerung humaner Spermatozoen vor geplanter Insemination. Bei Patienten mit Oligozoospermie besteht jedoch häufig eine reduzierte Kryotauglichkeit des Ejakulats. Gleiches gilt für onkologische Patienten, denen vor Therapie aufgrund drohender Infertilität die Anlage eines Kryospermadepots empfohlen wird.

An den Ejakulaten von 83 Patienten mit hochgradiger Oligozoospermie (maximale Spermatozoenkonzentration $5,0 \times 10^6/\text{ml}$) wurde deshalb untersucht, ob durch acht unterschiedliche Aufbereitungsverfahren mit Selektion motiler Spermatozoen vor geplanter Kryokonservierung die Gefrierfähigkeit verbessert und ein höherer Anteil vitaler Spermatozoen nach Kryokonservierung erzielt werden könnte. Als Kontrollgruppe diente bei 69 der 83 Patienten das jeweils unaufbereitete, nur mit Kryoprotektivum versetzte Ejakulat. Die einzelnen Methoden wurden mittels einer einfachen Varianzanalyse mit paarweisen Kontrasten nach der LSD-Methode (least significant difference) bezüglich der Zielparameter Motilität, Spermatozoenkonzentration und Vitalität verglichen (Signifikanzniveau 0,05). Ein Folgeversuche mit neun Ejakulaten überprüfte eine mögliche übermäßige Produktion reaktiver Sauerstoffspezies durch die Methode „Ankonzentrieren“.

Bezüglich des Zielparameters Motilität nach Kryokonservierung zeigte sich die Methode des Ankonzentrierens allen anderen Methoden einschließlich der unaufbereiteten Kontrolle überlegen und lieferte gemeinsam mit den unaufbereiteten Ejakulaten die geringsten Verluste der Spermatozoenkonzentration. Günstige Effekte hinsichtlich der Motilität konnten auch durch Stimulation mit Pentoxifyllin nach abgeschlossener Kryokonservierung erzielt werden. Bei Betrachtung der Immotilität nach Kryokonservierung lieferte die Gruppe der unaufbereiteten Ejakulate die besten Werte.

Für Ejakulate mit hochgradiger Oligozoospermie müssen Aufbereitungsverfahren vor Kryokonservierung zeitlich kurz und mit möglichst geringer mechanischer Schädigung der Spermatozoen verbunden sein. Standard sollte weiterhin die Lagerung der unaufbereiteten Probe sein. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse wäre zusätzlich die Lagerung einer zuvor ankonzentrierten Probe zu erwägen, um das Auffinden vitaler Spermatozoen bei geringer Konzentration der Spermien im Ausgangsejakulat zu erleichtern.

7 Lebenslauf

Name: Ruth Elisabeth Volk
 Geburtsdatum/ -ort: 29. Dezember 1971, Waiblingen
 Familienstand: ledig

Schulbildung

1978 – 1982 Osterbachschule, Grundschule, Homberg/Efze
 1982 – 1991 Bundespräsident-Theodor-Heuss-Schule, Gymnasium, Homberg/Efze
 10.06.1991 Abitur

Studium

12/1991 – 11/1998 Studium der Humanmedizin, Justus-Liebig-Universität Gießen
 28.03.1994 Ärztliche Vorprüfung
 23.03.1995 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 12.09.1997 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
 10/1997 - 09/1998 Praktisches Jahr
 Klinik für Innere Medizin, Universitätsklinikum Gießen
 Klinik für Kinderheilkunde, Universitätsklinikum Gießen
 Department of Surgery/Department of Trauma and Orthopaedics,
 Royal London Hospital, St Bartholomews and the Royal London School of
 Medicine and Dentistry, London, Großbritannien
 26.11.1998 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Berufstätigkeit

03/1999 - 08/2000 Ärztin im Praktikum
 Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Kiel
 01.09.2000 Erteilung der Approbation
 09/2000 – 12/2000 Assistenzärztin
 Klinik für Neuropädiatrie, Universitätsklinikum Kiel
 Seit 01/2001 Assistenzärztin
 Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Kiel

8 Danksagungen

Herrn Prof. Dr. med Dr. med. habil. Schill danke ich für die Überlassung des Themas. Herrn PD Dr. med. Köhn danke ich für gute und ausdauernde Betreuung. Bei den Mitarbeitern der Labore für Andrologie und Spermatozoen-Funktionsdiagnostik des Zentrums für Andrologie der Uniklinik Gießen bedanke ich mich für die Einweisung in die erforderlichen Untersuchungstechniken und großzügige Hilfe während der Erstellung des praktischen Teils. Stellvertretend für die MTAs beider Labore seien hier Frau Peters und Frau Hantsch genannt. Herrn PD Dr. rer. nat. Henkel danke ich für Unterstützung bei der Durchführung des Folgeversuchs zur Messung reaktiver Sauerstoffspezies.

Besonders bedanken möchte ich mich bei meinen Eltern, die mir mein Studium ermöglicht haben und mich stets unterstützen.

Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.